

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del mecanismo de acción de dimetilfumarato y
teriflunomida en la esclerosis múltiple: búsqueda de
biomarcadores predictivos de respuesta**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Silvia Medina Heras

Directoras

Luisa María Villar Guimerans
Noelia Villarubia Migallón

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del mecanismo de acción de dimetilfumarato y
teriflunomida en la esclerosis múltiple.**

Búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta.

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

Silvia Medina Heras

Directoras

Luisa María Villar Guimerans

Noelia Villarrubia Migallón

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. SILVIA MEDINA HERAS,
estudiante en el Programa de Doctorado INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA,
de la Facultad de MEDICINA de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE DIMETILFUMARATO Y TERIFLUNOMIDA
DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE BÚSCUEDA DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA

y dirigida por: LOISA R VILLAR Y LOELIA VILLARROBIA

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 29 de SEPTIEMBRE de 2019

Fdo.: SILVIA MEDINA HERAS

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Dña Luisa María Villar Guimerans, Doctora en Farmacia y Jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

CERTIFICA: Que Dña Silvia Medina Heras ha realizado bajo su dirección su Tesis Doctoral titulada:
“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE DIMETILFUMARATO Y TERIFLUNOMIDA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA.”

Revisada la misma, reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctora, por lo que doy mi conformidad para su presentación a tal fin.

En Madrid, a veinticinco de septiembre de 2019



Fdo.: Dña Luisa María Villar Guimerans

Dña Noelia Villarrubia Migallón, Doctora en Biología e Investigadora en el Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

CERTIFICA: Que Dña Silvia Medina Heras ha realizado bajo su dirección su Tesis Doctoral titulada:
“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE DIMETILFUMARATO Y TERIFLUNOMIDA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA.”

Revisada la misma, reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctora, por lo que doy mi conformidad para su presentación a tal fin.

En Madrid, a veinticinco de septiembre de 2019



Fdo.: Dña Noelia Villarrubia Migallón

*A mis padres
y a mi hermana,*

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo, tanto profesional como personalmente.

Mi primer agradecimiento va dirigido a los pacientes de la Unidad de Esclerosis Múltiple por su colaboración y confianza en nuestro grupo. Este trabajo no habría sido posible sin su inestimable participación.

Gracias a mis directoras de tesis por su dedicación, docencia y asesoramiento. Gracias May por darme la oportunidad de unirme al grupo de investigación, confiar en mí durante este periodo y apoyarme en mi carrera profesional. Gracias Noelia por compartir conmigo tus conocimientos de citometría, por tu visión científica y por tu apoyo moral.

Gracias a los facultativos, personal técnico y residentes del Servicio de Inmunología y Neurología del Hospital Ramón y Cajal que han contribuido directamente en este trabajo, en mi formación como especialista e investigadora o acompañándome en esta etapa. Quiero hacer una mención especial a mi querido grupo “Inmunocañas”, ha sido un lujo compartir estos años con vosotras. Hemos recorrido juntas un camino que no siempre fue fácil pero que nos hizo aprender y crecer. Me enseñasteis que el compañerismo y la amistad pueden convivir. Gracias por escucharme y aconsejarme, no habría sido lo mismo sin vosotras. Carmen, muchas gracias por acogerme en Londres, aprendí mucho en esos meses. Mercedes, gracias por estar ahí cuando las chicas fueron encontrando su sitio fuera del laboratorio.

Gracias a mis padres por su apoyo incondicional en cada paso de mi vida, por facilitarme una formación académica y un hogar que me han permitido llegar hasta aquí. Sin vosotros esto no habría sido posible. A mi padre por animarme a estudiar la carrera que realmente me gustaba a pesar del panorama laboral que creía que me esperaba; a mi madre por enseñarme que muchas veces si se quiere se puede. A mi hermana, por estar siempre y por creer en mí. Cris, gracias por acompañarme y ayudarme a descubrir mi camino, aunque eso nos separe; es increíble que me conozcas mejor que yo misma. A mi abuela Juana, una de las mujeres más fuertes que he conocido.

Javi, gracias por tu apoyo, tu comprensión y tus ánimos cuando no veía el final. Gracias por apoyarme en mi camino profesional, aunque me lleve lejos.

Gracias a todos.

Índice

Índice

Resumen.....	5
Abreviaturas	15
Introducción	19
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	21
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	22
1.3. ETIOPATOGENIA	24
1.3.1 Factores genéticos.	24
1.3.2. Factores ambientales.	25
1.4. FORMAS CLÍNICAS	27
1.5. DIAGNÓSTICO.....	28
1.5.1. Estudios clínicos.	28
1.5.2. Estudios paraclínicos.	28
1.6. FISIOPATOLOGÍA	30
1.6.1. Linfocitos T.	30
1.6.2. Linfocitos B.	33
1.6.3. Células Natural Killer.	34
1.6.4. Macrófagos y microglía.	34
1.7. TRATAMIENTOS.....	35
1.7.1. Dimetilfumarato.....	39
1.7.2. Teriflunomida.....	42
1.8. BIOMARCADORES.....	44
1.8.1. Biomarcadores de respuesta al tratamiento.	44
1.8.2. Biomarcadores predictores de efectos adversos.....	47
Justificación	49
Hipótesis y objetivos	49
Publicaciones.....	53
4.1. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile.	55
4.2. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients.	69
Discusión	81
5.1. Estudio con dimetilfumarato en pacientes con EMRR.....	88
5.2. Estudio con teriflunomida en pacientes con EMRR	96
Conclusiones	103
Bibliografía	107
Anexos	131

ANEXO A. Búsqueda de biomarcadores de respuesta al tratamiento con teriflunomida. ...	133
ANEXO B. Patente obtenida como resultado del estudio de dimetilfumarato.....	138
ANEXO C. Artículos relacionados	139

Resumen

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central que induce desmielinización, inflamación y daño axonal. Este último es el responsable de la discapacidad que sufren los pacientes. Aparece mayoritariamente en la segunda y tercera década de la vida y es más frecuente en mujeres que en hombres (ratio 3/1). La etiología de la enfermedad se desconoce, aunque se han identificado diferentes factores ambientales que favorecen la aparición de la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos. La EM se caracteriza por su gran variabilidad sintomática determinada por la localización de lesiones desmielinizantes en el sistema nervioso central.

Aunque no existe una cura para la enfermedad, se dispone de más de una decena de fármacos modificadores del curso de la enfermedad. Esta gran variedad de fármacos hace necesaria la búsqueda de biomarcadores capaces de predecir la respuesta al tratamiento, que contribuyan a establecer una terapia personalizada en la EM. Se han descrito diversos biomarcadores útiles en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, sin embargo, aún se necesita profundizar en la investigación de nuevos biomarcadores de respuesta a las distintas terapias.

Entre los últimos fármacos de administración oral aprobados para el tratamiento de la forma remitente recurrente (la forma más frecuente de la enfermedad) se encuentran dimetilfumarato y teriflunomida. Ambos han demostrado su eficacia en diversos ensayos clínicos, aunque su efecto sobre el sistema inmunitario todavía no está claro y son necesarios más estudios que pongan de manifiesto su impacto sobre las diferentes poblaciones leucocitarias y la utilidad de las mismas como biomarcadores de respuesta.

Objetivos y métodos

Los objetivos de esta tesis fueron:

- La identificación de los cambios en subpoblaciones leucocitarias hemáticas y en la producción de citocinas por linfocitos T y B en pacientes de EM tratados con dimetilfumarato.
- La búsqueda de biomarcadores que identificasen de forma precoz a los respondedores óptimos a dimetilfumarato.
- La identificación de los cambios en subpoblaciones leucocitarias circulantes y en la producción de citocinas por linfocitos T y B en pacientes de EM tratados con teriflunomida.
- La búsqueda de biomarcadores que identificasen de forma precoz a los respondedores óptimos a teriflunomida.

Para ello estudiamos una amplia variedad de poblaciones leucocitarias circulantes antes de iniciar el tratamiento y después de 6 meses del mismo en 64 pacientes tratados con dimetilfumarato y 55 tratados con teriflunomida. Además, se monitorizó la respuesta clínica y radiológica en ambos grupos de pacientes con un seguimiento de un año.

Resultados

En el grupo total de pacientes tratados con dimetilfumarato observamos un aumento de los linfocitos T naïve y una disminución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria efectora y CD8+ terminalmente diferenciados (TD) durante el tratamiento. Además, los respondedores óptimos mostraron una reducción significativa en los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central, células B de memoria, linfocitos T CD4+ productores de IFN-gamma, linfocitos T CD8+ productores de TNF-alfa e IFN-gamma y células B TNF-alfa +. Además, se observó un aumento de células NK CD56 bright exclusivo de este grupo, que correlacionaba negativamente con los linfocitos T CD8+ TNF-alfa+ e IFN-gamma+. Por tanto, el tratamiento con dimetilfumarato induce

una reprogramación del sistema inmunitario con un aumento de poblaciones reguladoras y una disminución de poblaciones efectoras. Además, el grupo de los respondedores óptimos a dimetilfumarato se puede identificar a los seis meses de tratamiento por una disminución de la población de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central, de linfocitos B de memoria y de la producción de citocinas proinflamatorias por linfocitos T y B, así como por un aumento de células NK CD56 bright.

Los pacientes tratados con teriflunomida experimentaron después de 6 meses de tratamiento una disminución de los porcentajes de linfocitos T CD4+ TD y de plasmablastos. Además, este tratamiento indujo una reducción en la expresión de CD69 por los linfocitos T CD4+. No encontramos cambios en la producción intracelular de citocinas proinflamatorias. Dentro del grupo de células reguladoras, teriflunomida indujo un aumento en los porcentajes de linfocitos T CD8+ y monocitos productores de IL-10. También produjo un claro aumento del porcentaje y número de monocitos que expresan PD-L1, que correlacionaba negativamente con el porcentaje de linfocitos T CD8+ efectores. Estudiamos el efecto del bloqueo de PD-L1 sobre células mononucleares de sangre periférica en cultivo y observamos una mayor tasa de proliferación en los linfocitos TD. Estos cambios se observaron tanto en los respondedores óptimos como en los subóptimos, aunque la disminución de CD4+ TD era más patente en el primer grupo. No encontramos cambios en la producción intracelular de citocinas proinflamatorias antes y después del tratamiento.

Finalmente estudiamos los cambios asociados a la respuesta óptima a teriflunomida. Observamos una disminución de los linfocitos T CD8+ TD y un aumento de las células NK CD56 bright en los respondedores óptimos a los 6 meses del tratamiento.

En resumen, el tratamiento con teriflunomida induce una disminución de linfocitos T CD4+ TD y de plasmablastos, y un aumento de linfocitos T CD8+ IL-10+ y monocitos IL-10+ y de monocitos PD-L1+. Además, los respondedores óptimos mostraron una disminución de células T CD8+ TD

y un aumento de las células NK CD56 bright. Esta última subpoblación podría ser un buen candidato para detectar tras seis meses de tratamiento a los respondedores óptimos a teriflunomida.

Conclusiones

Ambos tratamientos producen un cambio en el perfil inmunológico alterado de los pacientes, con una disminución específica para cada tratamiento de ciertas poblaciones efectoras, así como una inducción de ciertas poblaciones inmunorreguladoras, con la consecuente inhibición de la respuesta inflamatoria, responsable de la mejoría asociada al tratamiento. Además, se proponen varios marcadores predictores de respuesta a los seis meses para cada tratamiento como son la disminución de la población de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central, de linfocitos B de memoria y linfocitos T y B productores de citocinas proinflamatorias para dimetilfumarato y un aumento de células NK CD56 bright para ambos tratamientos.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune chronic disease of the central nervous system inducing demyelination, inflammation and axonal damage, which is responsible for the neurological damage suffered by MS patients. It appears mainly in the second and third decades of life and is more frequent in women than in males (ratio 3/1). The exact causes of the disease are unknown, although there are different environmental factors that favor the appearance of the disease in genetically predisposed individuals. MS shows a wide variety of symptoms determined by the location of the demyelinating lesions in the central nervous system.

Although there is no cure for the disease, there are more than ten drugs that modify the disease course approved for MS treatment actually. This makes necessary to search for biomarkers capable of predicting the treatment response and contribute to a personalized therapy in MS. Different biomarkers useful in the diagnosis and prognosis of the disease have been described, however much research is needed to find biomarkers predicting response to treatment.

Among the last orally approved drugs for the treatment of relapsing remitting forms are dimethyl fumarate and teriflunomide. They have demonstrated their efficacy in various clinical trials, although their effect on the immune system is still unclear and more studies are needed to show their impact on different immune cell populations and their ability as response biomarkers.

Objectives and methods

The objectives of this work were:

- To identify the changes in leukocyte blood subsets and in the production of cytokines by B and T cells induced by dimethyl fumarate in MS patients.
- The search for biomarkers for the early identification of optimal responders to dimethyl fumarate.

- To identify the changes in leukocyte blood subsets and in the production of cytokines by B and T cells induced by teriflunomide in MS patients.
- The search for biomarkers for the early identification of optimal responders to teriflunomide.

We studied a wide number of blood leukocyte subsets before treatment initiation and 6 months after in 64 patients treated with dimethyl fumarate and 55 treated with teriflunomide. Clinical and radiological response to treatment was monitored during a year of follow-up.

In the total group of patients treated with dimethyl fumarate we observed an increase in naïve T lymphocytes and a decrease of effector memory CD4+ and CD8+ T cells, and of terminally differentiated (TD) CD8+ T cells during treatment. Additionally, optimal responders showed a significant reduction in central memory CD4+ and CD8+ T cells, memory B cells, CD4+ T cells producing IFN-gamma, CD8+ T cells producing TNF-alpha and IFN-gamma and of B cells TNF-alpha+. In addition, as well as an increase in CD56 bright cells, which negatively correlated with the percentages of CD8+ T lymphocytes TNF-alpha+ and IFN-gamma+. Therefore, dimethyl fumarate treatment induces reprogramming of the immune system with an increase regulatory cells, and a decrease in effector memory ones. Moreover, optimal responders to dimethyl fumarate can be identified after six months of treatment by a decrease in central memory CD4+ and CD8+ T cells, memory B cells and in T and B cells producing anti-inflammatory cytokines and an increase in CD56 bright NK cells.

Patients treated with teriflunomide experienced after 6 months of treatment a decrease in the percentages of TD CD4+ T cells and plasmablasts. This treatment also induced a reduction in the expression of CD69 by CD4+ T lymphocytes. We found no changes in the intracellular production of pro-inflammatory cytokines by B or T cells. Regarding regulatory cells, we observed an increase in CD8+ T cells and monocytes producing IL-10. We also detected a clear increase in the percentage and number of monocytes expressing PD-L1, which correlated negatively with the

percentage of effector CD8⁺ T lymphocytes. We studied the effect of blocking PD-L1 in cultured peripheral blood mononuclear cells. It induced an increase of proliferation rate in TD T cells. These variations were observed in optimal and suboptimal responders, although the decrease in TD CD4⁺ T cells was more evident in the first group. We did not find any changes in the secretion of pro-inflammatory cytokines by T and B cells upon teriflunomide treatment.

Finally, we studied changes associated to optimal response. We observed a decrease in TD CD8⁺ T cells and an increase of CD56 bright NK cells in the group of optimal responders after 6 months of treatment.

Briefly, teriflunomide treatment with induces a decrease in TD CD4⁺ T cells and plasmablasts, as well as an increase in of T CD8⁺ IL-10⁺ lymphocytes and IL-10⁺ monocytes and of tolerogenic monocytes expressing PD-L1. Moreover, optimal responders showed a decrease of TD CD8⁺ T cells and an increase of CD56 bright NK cells after six months of teriflunomide treatment. This last subset could be a good biomarker to detect after 6 months of treatment, optimal responders to of optimal response to teriflunomida in MS.

Conclusions

Both treatments produce a change in the abnormal immune profile of patients, with a specific decrease of certain effector subset and an induction of some immunoregulatory ones. In addition, several response predictive markers after six months of follow-up were found for every treatment, such as a decrease in central memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells, memory B cells and of T and B cells producing pro-inflammatory cytokines for dimethyl fumarate and an increase in CD56 bright NK cells for both treatments.

Abreviaturas

BHE	barrera hematoencefálica
BOC	bandas oligoclonales
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
DHODH	dihidro-orotato deshidrogenasa
DSS	<i>Disability Status Scale</i>
E1P	esfingosina 1-P
EDSS	<i>Expanded Disability Scale</i>
EM	esclerosis múltiple
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
IFN	interferón
IL	interleucina
LMP	leucoencefalopatía multifocal progresiva
LCR	líquido cefalorraquídeo
MEDA	<i>Minimal disease activity</i>
NEDA	<i>no evident disease activity</i>
NF	<i>Nuclear factor</i>
NK	células <i>natural killer</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-derived 2</i>
JC	John Cunningham
OCT	tomografía de coherencia óptica
ODA	ongoing disease activity
PP	primaria progresiva
RM	resonancia magnética
RR	remitente-recurrente
SNC	sistema nervioso central
SP	secundaria progresiva
Th	<i>T helper</i>
TNF	factor de necrosis tumoral
Treg	T CD4+ reguladores
VEB	virus de Epstein-Barr

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central que afecta a más de dos millones de personas en el mundo, siendo la causa más frecuente de discapacidad neurológica en adultos jóvenes.

Se desconocen las causas exactas que desencadenan la EM, aunque se han identificado diferentes factores ambientales capaces de desencadenar la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos.

Es una enfermedad muy heterogénea en su clínica y evolución. Se caracteriza por la aparición de lesiones focales desmielinizantes, cuya localización determinará las manifestaciones clínicas (debilidad en miembros, déficits sensoriales, ataxia, alteraciones visuales), y por daño axonal, responsable de la discapacidad a largo plazo. La forma más común de presentación (85% de los casos) es la remitente-recurrente (RR), que aparece entre los 18-35 años y se caracteriza por presentar episodios de empeoramiento agudo (brotes) seguidos de periodos de recuperación completa o parcial.

La EM es una enfermedad de naturaleza autoinmune. En las lesiones desmielinizantes se observan infiltrados de macrófagos, linfocitos T y en menor medida de linfocitos B.

En las últimas dos décadas, los tratamientos modificadores de la enfermedad han sufrido una revolución. Desde la introducción en 1993 de interferón (IFN) beta-1b, el desarrollo posterior de nuevas herramientas terapéuticas ha progresado rápidamente mejorando la eficacia en la disminución de los brotes, lesiones y en la progresión de la enfermedad.

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

La EM se conoce como una entidad clínica desde hace más de 140 años. Las primeras descripciones patológicas fueron hechas por Cruveilhier (1835) (1) y Carswell (1838) (2), pero no fue hasta 1868, cuando Charcot realizó la primera descripción detallada de las manifestaciones

clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad, denominándola esclerosis en placas (3). En 1884, Pierre Marie asoció por primera vez la enfermedad con infecciones virales, describiendo una exacerbación de la misma tras periodos de fiebre e infección (4). Por su parte, Thomas River en 1935, asentó las bases autoinmunes, demostrando que la encefalitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal de la enfermedad, era desencadenada por componentes propios del sistema nervioso central (SNC) (5).

La primera punción lumbar que se conoce fue realizada por Quincke en 1891 (6), lo que permitió estudios posteriores en dicho fluido, como el de Kabat en 1942, que evidenció el papel del sistema inmunológico en la enfermedad describiendo un aumento de inmunoglobulinas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes (7).

Desde el punto de vista clínico, los primeros criterios diagnósticos de la enfermedad fueron publicados por Schumacher en 1965 (8) y perfeccionados por Poser en 1983 (9). En la actualidad, se usan los criterios de McDonald que se revisan periódicamente, siendo la última actualización en 2017 (10). En cuanto a las escalas de valoración de la discapacidad, cabe destacar la primera escala, *Disability Status Scale* (DSS), elaborada por Kurtzke en 1955 (11), así como su versión extendida, *Expanded Disability Scale* (EDSS), publicada en 1983 y que es la más usada en la actualidad (12).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Los primeros estudios epidemiológicos (1970-1980) de la EM a nivel mundial definieron un patrón geográfico latitudinal de prevalencia, identificando tres zonas de riesgo en función de la distancia al ecuador: alto riesgo (>30 casos/100.000 habitantes), riesgo medio (5-29 casos) y bajo riesgo (<5 casos). Se estableció que las zonas de riesgo alto abarcaban el norte de Europa y de Estados Unidos y Canadá. Las zonas de riesgo intermedio se centraban en el norte de Australia y el sur de Europa; y las de bajo riesgo en Asia, África y el resto de América (13,14).

Sin embargo, en las últimas décadas se han realizado numerosos estudios en pequeñas zonas geográficas del sur de Europa, hallándose frecuencias más elevadas que las descritas por Kurtzke, situando a España en una zona de riesgo medio/alto (15,16).

En 2013, la OMS publicó su segundo atlas de EM, proporcionando una herramienta actualizada que aúna los estudios epidemiológicos. Observaron que el número de enfermos había aumentado de 2.1 millones en 2008 a 2.3 millones en los últimos 5 años (17). En este año se registraron un total de 2 millones de pacientes en el mundo, con una media global de prevalencia de la enfermedad de 33 casos por cada 100.000 habitantes. Aunque la esclerosis múltiple está presente en todas las regiones del mundo, su prevalencia varía mucho geográficamente. Los niveles más altos se encontraron en América del norte y Europa (140 y 180 por 100.000 respectivamente) y los más bajos en África subsahariana y Asia oriental (2.1 y 2.2 por 100.000) (17). En concreto, la prevalencia oscila entre 100-125 casos cada 100.000 habitantes en España.

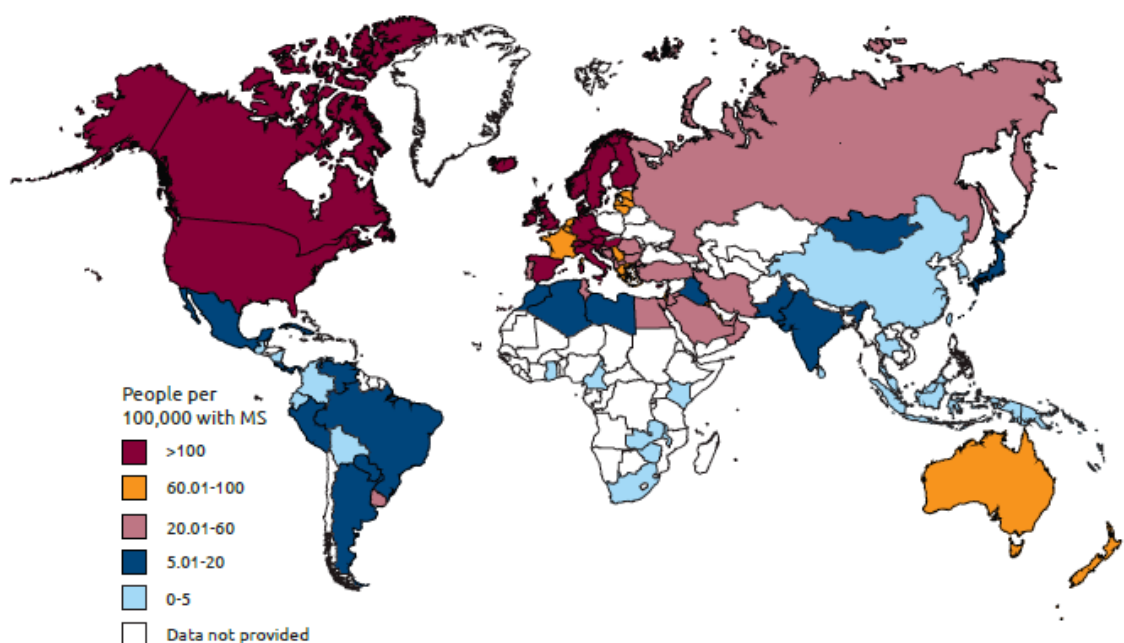


Figura 1. Prevalencia mundial de EM. Imagen extraída de *Atlas of MS* (2013).

La EM afecta a más mujeres que hombres (18) y la mayoría de los pacientes debuta a una edad adulta temprana, aunque hay casos descritos tanto en la infancia (19) como en adultos mayores de 60 años (20).

1.3. ETIOPATOGENIA

En la actualidad no se ha identificado ningún factor causal de la enfermedad, sin embargo, los estudios epidemiológicos apuntan a un modelo multifactorial, en el que diferentes componentes genéticos y ambientales podrían ejercer un efecto combinado sobre el riesgo de desarrollar la enfermedad (21).

1.3.1 Factores genéticos.

Los estudios familiares han sido una herramienta clave para demostrar la existencia de un componente genético. La incidencia en parientes de primer grado de enfermos con EM oscila entre el 2-5%, mientras que en la población general es inferior al 0.1%. Además, existe una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos (20-30%) que entre dicigóticos (2-5%) y se ha observado que el riesgo disminuye en los parentescos distantes (22,23). Por otro lado, los cónyuges e hijos adoptados de enfermos presentan un riesgo similar al presente en la población general.

Los genes del complejo HLA se asocian fuertemente al desarrollo de la enfermedad. En concreto, los de clase I y clase II, encargados de la presentación antigénica a linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente, son particularmente relevantes como modificadores del riesgo (24). La asociación positiva más fuerte se encuentra con el locus HLA DRB1*1501 (*odds ratio* (OR) de 3), aunque se han descrito otros alelos de riesgo (*DRB1*13:03*, *DRB1*03:01*, *DRB1*08:01*, *DQB1*03:02*) y protectores (*A*02:01*, *B*44:02*, *B*38:01*, and *B*55:01*) pertenecientes a este complejo (25).

Otras asociaciones destacadas con la elevación del riesgo fuera del complejo HLA, son determinados polimorfismos en el receptor de interleucina (IL)-2, de IL-7 (26) y del factor de necrosis tumoral (TNF) (27), así como polimorfismos en el factor nuclear Nf- κ B (28).

En los últimos años, la aplicación de nuevas tecnologías, como GWAS (*Genome Wide Association Studies*), ha permitido identificar más de un centenar de polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP, Single Nucleotide Polimorphism*) con una modesta influencia en el riesgo de desarrollar EM, en los que es necesario trabajar en sus implicaciones funcionales. La mayoría de estos polimorfismos se dan en moléculas asociadas con la respuesta inmune, lo que confirma la naturaleza autoinmune de la enfermedad.

Todos estos datos apoyan la hipótesis de un modelo de herencia poligénica, en el que el riesgo genético de padecer la enfermedad sería el resultado de las contribuciones modestas de alelos de riesgo de múltiples genes polimórficos.

1.3.2. Factores ambientales.

Aunque los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis, existen varios hechos que apoyan la intervención de factores ambientales en el aumento del riesgo de desarrollar EM. En primer lugar, la distribución de la enfermedad es heterogénea, observándose un gradiente latitudinal decreciente de norte a sur en el hemisferio norte y viceversa en el hemisferio sur (29). Además, la falta de concordancia total entre gemelos monocigóticos (22,23), así como el aumento de la incidencia mundial en mujeres en los últimos años (30,31), son otros datos que apoyan la existencia de factores diferentes a los genéticos. Por último, varios estudios de migraciones han evidenciado que la transferencia del riesgo depende de la edad de migración, de forma que individuos menores de 15 años adquieren el riesgo de la zona a la que migran, mientras que los mayores de 15 años conservan el riesgo de la zona de origen (32,33).

Si bien la identificación de factores ambientales todavía está en curso, los más conocidos y mejor caracterizados son la infección por determinados virus, la deficiencia de vitamina D, la obesidad

o el tabaquismo. Además, el papel de la microbiota intestinal como factor de riesgo está cobrando una importancia creciente en los últimos años.

Diversos agentes infecciosos, especialmente virus, han sido propuestos como posibles desencadenantes de la EM, siendo el virus de Epstein-Barr (VEB) el candidato más interesante. Aunque el 90% de los adultos sanos han estado en contacto con el virus, se ha observado que los individuos con un título elevado de anticuerpos contra el mismo (34) o que hayan padecido mononucleosis en la adolescencia (35), tienen una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Además se ha observado una mayor reactivación del virus en pacientes de EM (36), y se ha postulado la presencia de linfocitos B con el virus reactivado en lesiones activas en el cerebro de pacientes (37). En esta dirección, se han encontrado linfocitos T específicos del virus que son capaces de reaccionar frente a antígenos del SNC (38). El mimetismo molecular, entre otras muchas, es una de las hipótesis que se baraja para explicar el papel del virus en el aumento del riesgo, sin embargo, no se ha confirmado como factor desencadenante.

El hallazgo de la variación latitudinal de la incidencia y prevalencia de la enfermedad ha desencadenado numerosos estudios sobre la influencia de la exposición solar y el papel de la vitamina D. Se ha descrito que niveles bajos en ambos factores correlacionan con un aumento del riesgo de padecer la enfermedad (39), así como niveles bajos de vitamina D en pacientes correlacionan con el momento del brote (40,41). Aunque no se ha demostrado el beneficio terapéutico del uso de la vitamina D, se ha observado que niveles altos de vitamina D se asocian con una disminución de neurofilamentos en LCR (42), así como con una baja actividad en resonancia magnética durante el tratamiento combinado con IFN-beta (43).

El tabaco también ha sido implicado en el desarrollo de EM, observándose un aumento del riesgo de padecer la enfermedad en fumadores (44,45) y exacerbación de la enfermedad en pacientes que continúan fumando tras el diagnóstico (46), así como aumento de la probabilidad de desarrollar anticuerpos neutralizantes frente a fármacos (47,48). El factor determinante

podría ser la irritación pulmonar producida como consecuencia del tabaco, ya que se ha observado un aumento del riesgo en fumadores pasivos (49), así como en individuos expuestos a solventes orgánicos (50), y una disminución del riesgo asociada al uso de tabaco oral (51).

Otros factores asociados con el desarrollo y exacerbación de la enfermedad son la obesidad infantil y adolescente (52,53), la alteración de ciclos circadianos (54) y un consumo elevado de sal (55).

Por último, existen estudios que demuestran la importancia de la microbiota en el modelo animal (56–58), así como la interacción de la misma con el sistema inmune (58–60). Parece que la microbiota intestinal de pacientes con EM contiene factores capaces de desencadenar la enfermedad en ratones (61). Algunos estudios recientes en pacientes identifican posibles microorganismos potencialmente asociados a la EM (58,62), sin embargo, se necesitan más trabajos que lo corroboren.

1.4. FORMAS CLÍNICAS

La EM se caracteriza por su gran variabilidad, cuyos síntomas y signos vienen determinados por el área del SNC afectada por las lesiones desmielinizantes. La actividad de la enfermedad se mide, por un lado, con la aparición de brotes clínicos o lesiones activas en el SNC, y por otro, mediante la evaluación del progreso de la discapacidad. Según las últimas modificaciones de 2013, es posible distinguir dos formas clínicas de presentación, la enfermedad remitente-recurrente y la enfermedad progresiva (63).

El 85% de los pacientes presentan una forma RR caracterizada por la aparición de brotes de disfunción neurológica más o menos reversibles que se repiten cada cierto tiempo. Dentro de este fenotipo se engloba el síndrome desmielinizante/neurológico aislado que consiste en un primer episodio agudo que afecta a una o varias áreas (ocasionalmente) y es la forma de debut del 80% de los pacientes (64). Ambas formas pueden ser activas o no activas (65).

La enfermedad progresiva se clasifica en primaria progresiva (PP), caracterizada por la acumulación progresiva de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, y en secundaria progresiva (SP), caracterizada por la acumulación progresiva de la discapacidad tras un curso inicial en brotes. Ambas formas se subclasifican, según el nivel de discapacidad en activa/con progresión, activa/sin progresión, no activa/con progresión y no activa/sin progresión (65).

1.5. DIAGNÓSTICO

Para realizar el diagnóstico de la EM se ha de demostrar la diseminación en tiempo y espacio, así como la exclusión de otras posibles causas. Es imprescindible realizar un diagnóstico diferencial que permita excluir causas alternativas ya que existen numerosas enfermedades sistémicas y localizadas que afectan al SNC como infecciosas, autoinmunes, metabólicas o degenerativas.

Debido a que no existe una característica patognomónica de la enfermedad ni una prueba única para el diagnóstico, se han incluido una combinación de datos clínicos y paraclínicos como criterios diagnósticos. En la actualidad, se utilizan los criterios de McDonald de 2017 (10).

1.5.1. Estudios clínicos.

La evidencia clínica depende fundamentalmente de la demostración objetiva de signos clínicos que pueden llevar a conformar una sospecha diagnóstica, pero que, en la mayoría de los casos, no son suficientes para establecer el diagnóstico. La característica clínica más llamativa es su variabilidad, ya que los síntomas y signos dependen de la localización de las lesiones que pueden ocurrir a lo largo de todo el neuroeje. Aun así, las alteraciones más frecuentes son motoras, sensoriales, visuales y del sistema autónomo. (64).

1.5.2. Estudios paraclínicos.

Las pruebas radiológicas y de laboratorio incluyen resonancia magnética (RM), análisis de LCR y potenciales evocados que tienen como objetivo la búsqueda de lesiones silentes y la

demostración de la naturaleza inflamatoria de la enfermedad para establecer un diagnóstico precoz.

- Pruebas de imagen:

La RM de cerebro y médula espinal es capaz de mostrar la presencia de lesiones en la sustancia blanca de los pacientes. Sin embargo, sólo este hallazgo no es diagnóstico ya que puede haber lesiones similares en otras patologías. La diseminación en el espacio se puede demostrar por una o más lesiones hiperintensas en T2 características de la EM en dos o más de las cuatro áreas características de la enfermedad en el SNC (periventricular, cortical o yuxtacortical, infratentorial y médula espinal) (10). La diseminación en el tiempo puede demostrarse por la presencia simultánea de lesiones que captan o no gadolinio ya en la primera resonancia o por la aparición de nuevas lesiones hiperintensas en T2 o captantes de gadolinio en nuevas resonancias (10).

- Estudio de LCR:

El contenido del LCR refleja las alteraciones patológicas en las enfermedades inflamatorias del SNC. Los pacientes con EM muestran un LCR de aspecto macroscópico normal y, en la mayoría de los casos, la celularidad no está alterada. La alteración más frecuente (95% de los pacientes) es la síntesis intratecal de IgG, que puede demostrarse cuantitativa y cualitativamente. Existen varios índices cuantitativos, como el de Tourtellotte (66) o de Reiber (67), y semicuantitativos, como el de Tibbling (68). Todos tienen en cuenta la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) usando las concentraciones de albúmina, sintetizada exclusivamente en el hígado, como factor corrector. De forma que, si aumentase la IgG por difusión, también lo haría la albúmina. El índice de Tibbling es el más sencillo ($(IgG\ LCR / IgG\ Suero) / (Albúmina\ LCR / Albúmina\ Suero)$), e indica síntesis intratecal de IgG si el cociente es superior a 0.77.

Por otra parte, los métodos cualitativos son más sensibles y consisten en la determinación de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en LCR mediante isoelectroenfoque (69,70). Aparecen en más del 95% de los pacientes con EM y aunque no son exclusivas de esta patología, son muy útiles

en el diagnóstico diferencial de la EM (71) y para establecer un diagnóstico precoz tras el primer brote de posible etiología desmielinizante (72).

- Potenciales evocados:

Los potenciales evocados miden la velocidad de conducción de distintas vías nerviosas tras la aplicación de un estímulo sensorial, siendo especialmente sensibles en la vía óptica. La desmielinización produce un enlentecimiento de la conducción con un aumento de las latencias y en algunos casos, alteración de la amplitud de las ondas. Estas alteraciones no son específicas de EM, por lo que deben valorarse en conjunto con el resto de pruebas.

1.6. FISIOPATOLOGÍA

El signo característico de todas las formas de EM es la presencia de placas o lesiones focales tanto en la sustancia blanca como gris del SNC, siendo el cerebro, el nervio óptico y la médula espinal las zonas más afectas. Las placas son áreas de desmielinización que se localizan alrededor de los capilares y vénulas y contribuyen al daño de la BHE. El mecanismo responsable de la alteración de la permeabilidad de la BHE no se conoce en profundidad, aunque la liberación de citocinas y quimiocinas al medio circundante es un hecho clave en este proceso. Los datos disponibles apuntan a una comunicación bidireccional entre diferentes células inmunes de sangre periférica y células residentes del SNC como microglía y astrocitos, cuya interacción induciría la liberación de mediadores inflamatorios por ambos grupos de células aumentando la permeabilidad de la BHE. Esto permite la migración transendotelial de linfocitos autorreactivos previamente activados que contribuyen al proceso inflamatorio y de desmielinización, así como a la pérdida de oligodendrocitos, degeneración axonal y gliosis. (73)

1.6.1. Linfocitos T.

Tradicionalmente, los linfocitos T han sido los principales protagonistas en el estudio de los mecanismos subyacentes a la enfermedad. Este hecho fue motivado por su presencia en las lesiones (74,75), por la asociación de determinados alelos de HLA con la enfermedad y por la

inducción de EAE mediante la transferencia de linfocitos T CD4+ reactivos frente a proteínas de la mielina.

Dentro de los linfocitos T CD4+, las poblaciones más relacionadas con la enfermedad han sido los linfocitos T *helper* (Th) 1 y Th17, situándose como protagonistas de las fases tempranas de la enfermedad. Ambas subpoblaciones T podrían activar a monocitos, microglía, astrocitos, linfocitos B y T CD8+ mediante la liberación de citocinas proinflamatorias como IFN-gamma, IL-17, GM-CSF y TNF-alfa contribuyendo así al daño de oligodendrocitos y neuronas (76–79). En relación con las Th17, se han descrito niveles elevados de IL-17 en lesiones del SNC, en LCR y en suero de pacientes (80).

Los linfocitos B, macrófagos, microglía o células dendríticas podrían actuar como células presentadoras de antígeno de los linfocitos T aberrantes desencadenando su activación en periferia o dentro del SNC. Diversos antígenos derivados de la mielina se han implicado como potenciales dianas en la EM, aunque actualmente no se conoce su repercusión real en la patología. En relación con la activación y diferenciación T, se han descrito monocitos con un perfil proinflamatorio (expresión de mir155, TNF-alfa, IL-12, IL-23 e IL-1beta) capaces de dirigir la respuesta hacia Th1 o Th17 en pacientes de EM (81,82).

Los linfocitos T CD8+ se encuentran en mayor proporción que los T CD4+ en las lesiones del SNC y en el infiltrado perivascular de pacientes con EM (74,75). Sin embargo, el cociente entre ambos es conservado en sangre periférica y se han descrito casos hasta de una proporción 6:1 en LCR (83). Pueden causar un daño neuronal directo mediante la producción de mediadores citotóxicos como perforina y granzima en respuesta al reconocimiento de péptidos presentados sobre moléculas de HLA-I, presentes en todas las células nucleadas (84). Su capacidad citotóxica juega un papel central en el daño axonal, según se demuestra en estudios inmunohistoquímicos *postmortem* que localizan los gránulos líticos en los axones y por la correlación existente entre estos hallazgos y el daño axonal (85). Además, se han encontrado niveles aumentados de granzima A en el LCR de pacientes con enfermedad activa comparados con pacientes en

remisión (86). Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ son capaces de liberar diversas citocinas proinflamatorias como IFN-gamma, IL-17 y TNF-alfa, cuya concentración se ha visto aumentada en los pacientes con EM (78,87,88). Además, la producción de GM-CSF por parte de CD4⁺ y CD8⁺ también se ha visto involucrada en la patogénesis de la EM, activando a monocitos y microglía (89).

La activación periférica de linfocitos T efectores podría deberse al mimetismo molecular con algún antígeno viral. En este sentido, se ha observado una relación de la enfermedad con infecciones por virus de la familia *Herpesviridae* como el virus de Epstein Barr o el Herpesvirus 6. También podría deberse a la liberación de antígenos del SNC a la periferia. La expansión de estos clones autorreactivos podría deberse al menos en parte a la falta de funcionalidad de las células reguladoras que se observa en esta enfermedad.

Dentro de las subpoblaciones reguladoras, los linfocitos T CD4⁺ reguladores (Treg) juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica. Antigénicamente se caracterizan por ser CD4⁺ CD25^{high} CD127^{-/low}, por expresar el factor de transcripción FoxP3 y liberar citocinas antiinflamatorias (IL-10). Varios experimentos en modelos de EAE han demostrado un papel protector en la enfermedad (90–92). Además, se han descrito diversas alteraciones de Treg en EM como la disminución de la expresión de FoxP3 o de IL-10 o alteraciones genéticas de CD25 (93–96). En biopsias cerebrales de pacientes con EM se ha observado la pérdida de expresión de FoxP3 y una ganancia de la expresión de Fas, un receptor de apoptosis celular, lo que parece indicar un aumento de la susceptibilidad de estas células a la apoptosis (97). También se ha reportado una pérdida de funcionalidad de estas células en sangre de pacientes comparado con individuos sanos (98).

Dentro de los linfocitos T CD8⁺, también se han descrito subpoblaciones con capacidad reguladora capaces de suprimir la respuesta inmune y la actividad de la enfermedad (99). Se ha visto que estas células disminuyen de forma significativa en los periodos de brote en LCR (100–102).

1.6.2. Linfocitos B.

Los linfocitos B también contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, hecho que se hace patente a raíz de diferentes hallazgos. La presencia de BOC de IgG en LCR fue el primer hallazgo que demostró la naturaleza autoinmune de la enfermedad y se produce como consecuencia de una expansión oligoclonal de células B en el SNC. También se ha observado la presencia de anticuerpos junto con proteínas del complemento en las lesiones, lo que indica la implicación de estas células en la enfermedad. La presencia de folículos linfoides ectópicos en las meninges se ha asociado con una mayor atrofia y un peor curso de la enfermedad (103). La efectividad de los fármacos anti CD20 para el tratamiento de la enfermedad es otro indicador de su indiscutible papel en el desarrollo de la EM. Sin embargo, estos fármacos no producen cambios a corto plazo en la presencia de BOC de IgG, lo que sugiere un papel adicional de las células B independiente de la producción de estos anticuerpos (104,105), como puede ser su capacidad para activar células T y monocitos o la inhibición de la síntesis intratecal de otras inmunoglobulinas como la IgM (106). Se ha visto que las células B de pacientes con EM presentan una tendencia a producir citocinas proinflamatorias (IL-6, GM-CSF, TNF-alfa y linfotoxina-a) y son deficientes en citocinas reguladoras como IL-10 (107–111). Además, los linfocitos B de memoria productores de TNF-alfa, GM-CSF e IL-6 están aumentados en la sangre periférica de pacientes con EM (108). Estas células B pueden inducir respuestas Th1 y Th17 a través de la liberación de TNF-alfa e IL-6 y respuestas proinflamatorias en células mieloides a través de la secreción de GM-CSF. Además, se ha observado la presencia de células B en LCR, con predominio de los fenotipos de memoria y plasmablastos que se han asociado con la actividad de la enfermedad (112). En la EM también se ha descrito una pérdida de la tolerancia periférica de las células B que a su vez puede estar influyendo sobre las T reguladoras (113). Además se ha descrito una disminución de la producción de IL-10 por su parte (109).

1.6.3. Células Natural Killer.

Las células *natural killer* (NK) son células de la inmunidad innata implicadas en la defensa frente a infecciones y tumores. Se ha sugerido que desempeñan un papel dual en la enfermedad ya que son capaces de liberar tanto citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias (114). Clásicamente se han distinguido dos grupos en función de la densidad de expresión del antígeno CD56 en superficie, las CD56 dim y las CD56 bright. Las primeras presentan una función mayoritariamente citotóxica a través de la liberación de perforina y granzima y de la presencia de receptores de muerte celular; mientras que las segundas desempeñan una función predominantemente secretora de citocinas. En pacientes con EM se ha visto que las células NK presentan alteraciones en su capacidad de inhibir clones autorreactivos (115). Por otro lado, se ha descrito un aumento de las NK CD56 bright inducido por varias terapias inmunomoduladoras (116,117).

1.6.4. Macrófagos y microglía.

La microglía y los macrófagos constituyen el 10% de las células residentes del SNC. La microglía se genera a partir de la migración de precursores fetales al SNC y su función principal es la regulación de la homeostasis, desempeñando funciones antiinflamatorias o proinflamatorias en función del ambiente. Esta capacidad de polarización también la muestran los macrófagos. Se ha descrito la presencia de microglía y macrófagos activados en las lesiones, observándose mayor densidad en aquellas que permanecen activas frente a las inactivas (118). Estas células activadas pueden contribuir a la diseminación de epítopos y activación de linfocitos T, al proceso de desmielinización y de fagocitosis de la mielina degradada, así como a la liberación de moléculas neurotóxicas como TNF-alfa, IL-1beta y especies reactivas de oxígeno (119). En EAE se ha visto un predominio de los fenotipos proinflamatorios en las fases iniciales de la enfermedad y la implicación de los fenotipos antiinflamatorios en los procesos de remielinización (120,121).

1.7. TRATAMIENTOS

Aunque existe una gran cantidad de opciones disponibles para el manejo de la enfermedad, no se ha desarrollado una terapia curativa hasta el momento. Actualmente existe un amplio abanico de terapias modificadoras del curso de la enfermedad (figura 2). Estos tratamientos se complementan con el tratamiento sintomático de los brotes y de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la respuesta inmunológica a los primeros.

Los agentes modificadores de la enfermedad pretenden alterar el curso de la misma disminuyendo la tasa de brotes y la aparición de nuevas lesiones en resonancia, así como la estabilización o mejoría de la discapacidad. Hasta ahora su uso sólo estaba aprobado en las formas en brotes. Recientemente se ha aprobado el primer fármaco (ocrelizumab) que ha demostrado ser efectivo en las formas primariamente progresivas de la enfermedad, si bien su eficacia global es limitada.

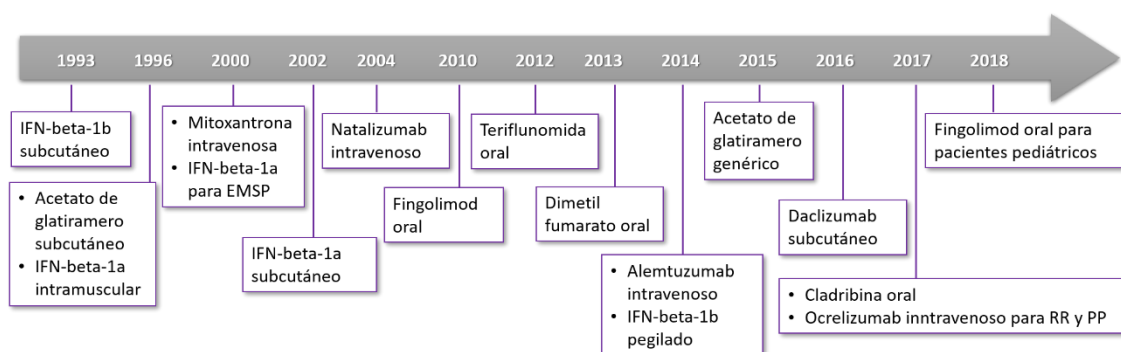


Figura 2. Evolución temporal de los tratamientos. Adaptado de *Tintore y cols (2019)*.

Primeros tratamientos inyectables

No fue hasta los años 90 cuando se introdujo el primer fármaco modificador de la enfermedad, el IFN-beta, cuyo uso sigue manteniéndose en la actualidad. El IFN-beta, seguido por el acetato de glatiramero, supusieron una revolución en el manejo de los pacientes, que hasta entonces sólo disponían de inmunosupresores. En la actualidad hay más de una decena de fármacos

aprobados para el tratamiento de EMRR y varios que se encuentran en desarrollo, siendo prometedor este progreso de los últimos 20 años.

El IFN-beta es un antiviral que ha demostrado su eficacia en la disminución de la tasa de brotes y de lesiones en resonancia. Induce una disminución alrededor del 30% de la tasa de brotes a los 2 años de tratamiento (122). Presenta un perfil de seguridad favorable, siendo necesaria la monitorización de enzimas hepáticas y del recuento leucocitario. Aunque su mecanismo de acción no se comprende completamente, existen evidencias de su intervención en el equilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, así como en la disminución del número de células inflamatorias que atraviesan la BHE (123).

Por su parte, el acetato de glatiramero es un péptido sintético capaz de unirse a MHC-II y polarizar la respuesta inmune hacia Th2 (124). Presenta una eficacia similar al IFN-beta (125). Se considera uno de los fármacos más seguros dentro de las terapias modificadoras de la enfermedad, con unos requerimientos mínimos de monitorización.

Fármacos orales

Hasta la aparición en 2010 de fingolimod, todos los fármacos disponibles eran de administración intramuscular o intravenosa. Fingolimod es un análogo de la esfingosina 1-P (E1P), un fosfolípido que regula diversas funciones fundamentales como la movilidad celular. Este fármaco ejerce su efecto a través del bloqueo del receptor de E1P, necesario para la salida de los linfocitos del timo y de los órganos linfoides secundarios (126). Se ha sugerido un efecto neuroprotector derivado de su capacidad de entrar en el SNC y unirse a neuronas y células de glía que expresen su ligando (127). Sin embargo, no ha demostrado su eficacia en el tratamiento de las formas progresivas. Es capaz de reducir hasta el 50% de la tasa de brotes y conseguir una disminución de la actividad en resonancia superior a la de IFN-beta (128,129). A pesar de ser un fármaco bastante seguro, puede presentar algunos efectos secundarios raros como infecciones herpéticas, bloqueo atrioventricular (sobre todo en la primera dosis) o edema macular (130).

Con la finalidad de mejorar el perfil de seguridad conservando su efectividad, se prueban nuevas moléculas inhibidoras de E1P, como sipinimod, ponesimod y ozanimod (131,132).

Cladribina es un análogo de deoxiadenosina capaz de producir daño en el ADN y muerte celular, un profármaco que una vez dentro de la célula se activa por la fosforilación de la desoxicitidinaquinasa (133). Posteriormente, esta molécula es hidrolizada e inactivada por la fosfatasa 5-nucleotidasa. Su efecto sobre las distintas células depende de la ratio quinasa/fosfatasa dentro de las mismas (134). Esto hace que tenga un efecto selectivo sobre linfocitos T y B de sangre periférica, aunque también ejerce una disminución sobre las células NK (135). Se trata de un fármaco de administración oral cuya eficacia se acerca a la de fingolimod. Su perfil de seguridad parece bueno, pero aún se dispone de datos limitados en práctica clínica fuera de los ensayos.

Dimetilfumarato y teriflunomida completan el grupo de fármacos orales disponibles para el tratamiento de la EM (apartado 1.7.1 y 1.7.2).

Tratamientos con anticuerpos monoclonales

En estos últimos 20 años se han desarrollado tratamientos muy eficaces como natalizumab o alemtuzumab, ambos anticuerpos monoclonales humanizados y de administración intravenosa que representan importantes opciones terapéuticas para las formas más agresivas de EM. Natalizumab va dirigido frente a alfa 4-integrina, una molécula de adhesión celular presente en la superficie de monocitos y linfocitos, bloqueando su unión a VCAM1 en la superficie endotelial. (136). Como consecuencia de su unión, inhibe la migración de estas células a través de la BHE al SNC, disminuyendo la inflamación del mismo. En ensayos clínicos ha mostrado una reducción del 68% de la tasa de brotes comparado con placebo, así como una disminución importante de la progresión de la discapacidad y de nuevas lesiones en resonancia (137). Como contrapartida a su eficacia, presenta un efecto secundario grave, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una infección oportunista causada por el virus JC (John Cunningham), que puede inducir

la muerte del paciente o un aumento considerable de la discapacidad (138). Aparece aproximadamente en uno de cada 250 pacientes tratados con natalizumab. Distintos biomarcadores han ayudado a estratificar el riesgo de LMP (139). Sin embargo, es necesaria la monitorización estricta de los pacientes tratados, incluso en los meses siguientes a la finalización del tratamiento.

Alemtuzumab, por su parte, se une a CD52 en la superficie de diferentes células del sistema inmunitario (sobre todo linfocitos T y B) e induce una rápida linfopenia seguida de una reprogramación de estas células (140). Ha demostrado disminuir la tasa de brotes y la progresión de la discapacidad de una forma similar a natalizumab (141). Sin embargo, su uso se ha asociado con efectos adversos significativos entre los que destacan el desarrollo de enfermedades autoinmunes secundarias (142) que van desde las más frecuentes como tiroiditis autoinmune, hasta las más graves e infrecuentes como la púrpura trombocitopénica o el síndrome de Goodpasture. Además, hallazgos recientes apuntan a la aparición de nuevas enfermedades autoinmunes y de patología isquémica en pacientes tratados con este fármaco, por lo que su uso se ha relegado temporalmente a la tercera línea.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales ha ido dirigido hacia el bloqueo de las moléculas CD20, principalmente. Rituximab, ocrelizumab y ofatumumab (en desarrollo) son anticuerpos anti CD20, que se unen selectivamente a linfocitos B y los deplecionan mediante activación del complemento o de células citotóxicas (143–145). Su mecanismo de acción no sólo se basa en la disminución de la producción de anticuerpos, sino también en la disminución de la activación T. Además, ocrelizumab ha demostrado su capacidad para disminuir la progresión clínica y en resonancia, y ha sido aprobado para las formas RR y PP (146).

El trasplante de progenitores hematopoyéticos se valora en pacientes no respondedores a terapias modificadoras de la enfermedad. Los pacientes jóvenes con una duración de la

enfermedad inferior a 5 años y con un curso agresivo serían los más beneficiados de esta opción terapéutica (147,148).

Actualmente, una de las estrategias emergentes para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas se centra en la inducción de tolerancia contra antígenos propios y en el restablecimiento de la homeostasis inmune mediante el uso de vacunas de ADN o nanopartículas, entre otras. Otra gran rama del desarrollo de nuevas terapias se centra en la identificación de moléculas neuroregeneradoras o inductoras de remielinización. En este sentido, se ha visto un efecto neuroprotector de tratamientos aprobados para otras patologías como el antiepiléptico fenitoína (149), el antihistamínico clemestina (150) o la simvastina usada para la disminución del colesterol sanguíneo (151). Además, anti-LINGO es un anticuerpo monoclonal sujeto a ensayos clínicos por su posible efecto sobre la remielinización (152).

1.7.1. Dimetilfumarato.

Dimetilfumarato es un agente oral de administración diaria aprobado en 2013 como tratamiento de primera línea en la EM. Desde el punto de vista molecular, consiste en un éster derivado del ácido fumárico que en condiciones fisiológicas actúa como intermediario del ciclo de Krebs.

Su eficacia ha sido evaluada en diversos ensayos clínicos (DEFINE, CONFIRM) (153,154). Los pacientes de ambos estudios tenían entre 18 y 55 años, con un EDSS de 0 a 5, y al menos 1 brote en el último año. Ambos estudios compararon dimetilfumarato frente a placebo con un seguimiento de 2 años. En el estudio conocido como DEFINE, dimetilfumarato disminuyó un 48% la tasa de brotes, un 38% la progresión de la discapacidad y un 85% el número de lesiones nuevas en resonancia (153). La eficacia en la disminución de los brotes fue confirmada en el ensayo clínico CONFIRM, no así la disminución de la progresión (154). Presenta un buen perfil de seguridad y tolerancia, con la excepción de la aparición de LMP en seis pacientes de un total de 385.000 tratados con el fármaco (155,156). La aparición de esta enfermedad oportunista se ha visto en pacientes de más de 50 años, con una linfopenia grado 3 mantenida; dicha linfopenia

aparece en alrededor de un 6% de los pacientes tratados con dimetilfumarato (156,157). Esta circunstancia obliga a una monitorización del recuento linfocitario cada tres meses durante el primer año de tratamiento, pudiéndose espaciar a 6 meses en años siguientes. El 50% de los pacientes puede presentar efectos secundarios no graves como irritación gastrointestinal, enrojecimiento o alteraciones cutáneas que son fácilmente controlados (154).

De acuerdo con su favorable perfil de seguridad y eficacia y a que se trata de un fármaco de administración oral, se ha convertido en uno de los fármacos más administrados en la EM.

El mecanismo que subyace al beneficio obtenido tras su uso es multifactorial y está bajo investigación. En los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones que ponen de manifiesto su efecto antioxidante, neuroprotector, antiinflamatorio e inmunomodulador, afectando a diversas poblaciones de células del sistema inmunitario como linfocitos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos, etc (158) (figura 3). Entre sus efectos se ha descrito una disminución del número de linfocitos y una alteración de la producción de citocinas, así como de la migración de leucocitos. Su efecto neuroprotector puede estar mediado a través de la activación de la transcripción del factor *nuclear factor erythroid-derived 2* (Nrf2), sensor del estado de oxidación celular en neuronas, astrocitos, microglia y leucocitos (159). *In vitro*, ha demostrado su capacidad de disociar el complejo formado por Nrf2 con su inhibidor (Keap1), produciendo su activación y la consiguiente transcripción de genes antioxidantes como *aldo-keto reductase family 1 member B10* (AKR1B10) y *NADP(H) quinoline oxidoreductase-1* (NQO-1) (160). En el modelo animal de EAE se ha observado un incremento de Nrf2 libre tras el tratamiento con dimetilfumarato que correlaciona con una mejora en el EDSS (159). Sin embargo, estudios con ratones deficientes en Nrf2, han evidenciado que no todo el efecto inmunomodulador es dependiente de esta vía, ya que en estos ratones tratados con dimetilfumarato se observa una disminución del riesgo de desarrollar EAE (161,162). Además, estos ratones experimentaron una disminución de los linfocitos Th1 y Th17, de las células B

MHC+ y de la expresión de VLA4 en linfocitos. Dimetilfumarato también es capaz de interaccionar con varias proteínas de la vía de NF- κ B (163). Entre ellas destaca la proteína kinasa C theta expresada en linfocitos T y responsable del ensamblaje del receptor de la célula T (TCR) con CD28 (164). A través de esta interacción se bloquea la liberación de IL-2 por los linfocitos T activados que conlleva una inhibición de la vía del NF- κ B responsable de la liberación de factores proinflamatorios (164). La vía del NF- κ B también se ve inhibida a través del receptor *hydroxycarboxylic acid receptor 2* (HCAR2), una proteína G presente en monocitos, microglía, neutrófilos y células dendríticas (165,166). En ratones deficientes para HCAR2 no se observa beneficio tras el tratamiento con dimetilfumarato (165). Por otro lado, dimetilfumarato produce una disminución inicial del antioxidante glutatión, que finaliza con un aumento del mismo (167,168). Esta disminución induce por un lado la expresión de proteínas antiinflamatorias como *heme oxygenase 1* (HO-1), que reduce la liberación de citocinas en linfocitos activados (169). Por otro lado, se produce una respuesta compensatoria para aumentar los niveles de glutatión que puede estar mediada a través de Nrf2 y de la estimulación de la vía de reciclado de glutatión (168,170). Por último, dimetilfumarato produce una inhibición de la glicólisis aeróbica en leucocitos a través de la interacción con la enzima glicolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (171). Esta ruta es necesaria para la producción de energía invertida en la proliferación, supervivencia y en la liberación de citocinas en los linfocitos efectores (172).

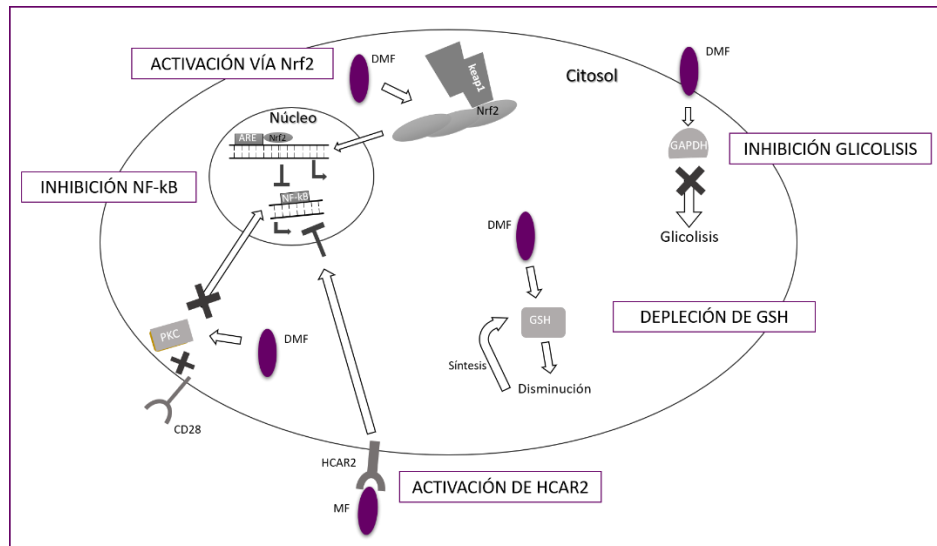


Figura 3. Mecanismo de acción de dimetilfumarato (DMF). *Modificada de Montes-Díaz y cols. (2018).*

1.7.2. Teriflunomida.

Teriflunomida es un fármaco oral modificador de la enfermedad, aprobado para el tratamiento de las formas RR. Es el metabolito activo de la leflunomida, un fármaco usado para el tratamiento de artritis reumatoide desde 1998.

Su eficacia ha sido demostrada en varios ensayos clínicos como TEMSO (173,174), TOWER (175), TENERE (176) o TOPIC (177). En el estudio TEMSO se incluyeron 1088 pacientes con edades comprendidas entre 18 y 55 años, a los que se les asignó aleatoriamente placebo, teriflunomida dosis baja o dosis alta durante 108 semanas. Presentaban un EDSS entre 0 y 5.5 y habían tenido al menos 1 brote en el último año. Ambas dosis disminuyeron la tasa de brotes en un 31,2 y 31,5 % respectivamente. Los dos grupos tratados con teriflunomida superaron al placebo en la prevención de la progresión de la discapacidad y en mejoras en resonancia, incluyendo el volumen total lesional, lesiones activas o captantes (173). Estos resultados fueron confirmados en TOWER con un diseño similar (175). En TOPIC se observó una disminución significativa en el riesgo de progresión a EM en pacientes con síndrome neurológico aislado (178). Sin embargo, teriflunomida no consiguió demostrar su superioridad al IFN-beta en TENERE (176).

Generalmente es bien tolerado y los efectos adversos más frecuentes son alopecia y elevación de enzimas hepáticas (179).

Este fármaco induce una inhibición reversible de dihidro-orotato deshidrogenasa (DHODH), una enzima mitocondrial implicada en la síntesis *de novo* de pirimidinas, particularmente activa en células proliferantes como los linfocitos activados (180). A través de la inhibición de esta enzima, teriflunomida detiene la producción de ácidos nucleicos necesaria para la proliferación de linfocitos T y B (figura 4). Diversos estudios han demostrado que teriflunomida es capaz de parar el ciclo celular en fase S (181–183) e impedir la formación de sinapsis inmunológica (184). Hasta la fecha, existen pocos estudios *ex vivo* de su efecto sobre el sistema inmune, aunque estudios preliminares han mostrado la disminución de linfocitos totales, T CD8+ y Th1 la disminución de citocinas Th1 (185–187).

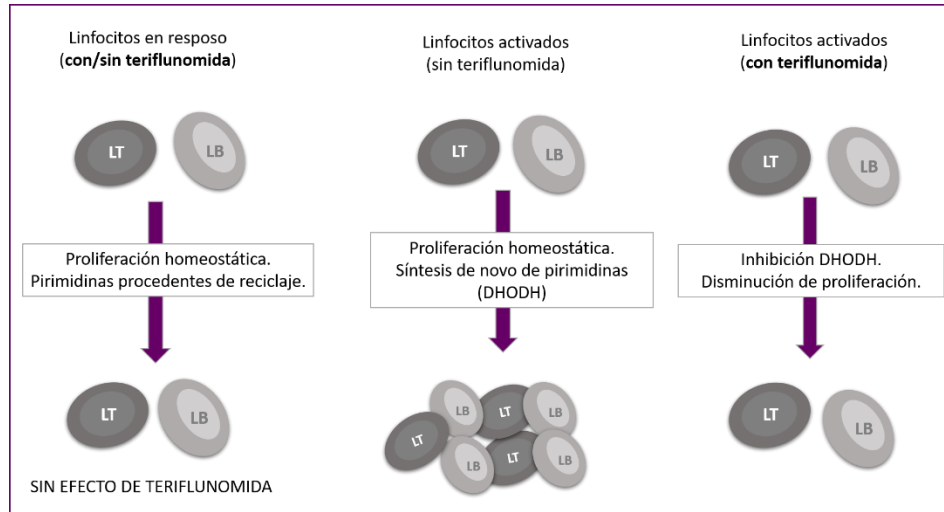


Figura 4. Mecanismo de acción de teriflunomida. *Modificada de Miller y cols. (2016).*

1.8. BIOMARCADORES

El grupo de trabajo de biomarcadores de la FDA-NIH los define como una característica medible que puede actuar como un indicador de un proceso biológico normal o patológico, así como de la respuesta a una exposición o intervención (188). Bajo este término se engloban los biomarcadores de riesgo o susceptibilidad, diagnósticos, pronósticos y de monitorización de tratamiento.

En EM se han descrito diversidad de biomarcadores útiles en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad como la presencia de bandas oligoclonales de IgG e IgM, de neurofilamentos en LCR y suero, de quitinasa en LCR, entre otros (10,189,190). Sin embargo, la investigación de biomarcadores capaces de monitorizar tratamientos no está avanzando a la misma velocidad que el desarrollo de las nuevas terapias. El rápido avance en el desarrollo de nuevos fármacos hace necesaria la descripción de biomarcadores capaces de predecir la respuesta al tratamiento y de ayudar así a la selección del fármaco con mejor perfil riesgo/beneficio para un paciente concreto.

Dentro de este grupo de biomarcadores, podemos encontrar biomarcadores de respuesta al tratamiento y biomarcadores predictores de efectos adversos.

1.8.1. Biomarcadores de respuesta al tratamiento.

Son aquellos capaces de identificar a los pacientes con elevada probabilidad de responder de manera óptima a un determinado fármaco.

Las primeras moléculas utilizadas como biomarcadores de respuesta al tratamiento fueron los anticuerpos neutralizantes. Estos son producidos tras la administración de algunos fármacos de naturaleza proteica y tienen como consecuencia la disminución de su biodisponibilidad. Los anticuerpos anti IFN-beta son de los que más datos se dispone. Se ha descrito que su presencia mantenida en el tiempo y a títulos elevados presenta un efecto negativo sobre la actividad y la progresión de la enfermedad (191) y pueden ser usados para identificar a los no respondedores

(192,193). También se ha visto la presencia de anticuerpos neutralizantes en pacientes tratados con acetato de glatiramero (194) y natalizumab (195,196). En el primer caso, su presencia no se asocia con una disminución de la eficacia del fármaco contra el que van dirigidos, y en el caso de alemtuzumab, solo se asocian con una disminución de la eficacia si se mantienen en el tiempo (195,196).

Otro grupo de marcadores extensamente estudiados son moléculas solubles implicadas en inflamación. Niveles elevados de IL-17 al inicio del tratamiento se han relacionado con una disminución de la eficacia de IFN-beta (197). Por el contrario, niveles bajos de IL-10 antes de la terapia (198), así como ausencia de BOC IgM (199), se han asociado con una elevada probabilidad de responder óptimamente al tratamiento con IFN-beta. La disminución de la síntesis intratecal de IgM en pacientes tratados con natalizumab se asocia con una respuesta completa al fármaco (200). También se ha descrito disminución de quimiocinas en LCR como CXCL13 bajo el tratamiento con natalizumab (201) y de CXCL13 y CCL19 con rituximab (202), lo que las convierte en potenciales biomarcadores.

Los neurofilamentos en LCR son una herramienta útil para la detección de inflamación y neurodegeneración en el SNC (189) y también pueden ser usados para la monitorización del tratamiento. El tratamiento con fingolimod induce una disminución de sus niveles tras un año, correlacionando con una mejora de la tasa de brotes y de las lesiones (203). Natalizumab y rituximab también producen su disminución aunque no se ha podido correlacionar con la respuesta al tratamiento (204,205). Recientemente se ha comercializado un método capaz de detectar neurofilamentos en suero y los primeros estudios muestran variaciones en sus niveles bajo tratamientos inmunomoduladores (206).

Los leucocitos de sangre periférica presentan un papel importante en el desarrollo de la patogenia de enfermedades inmunomediadas y pueden ser modificados por las terapias. Estos dos hechos los convierten en potenciales herramientas para la monitorización del tratamiento.

Se ha descrito que un porcentaje de linfocitos CD19+ CD5+ inferior al 3% o de CD8+ perforina+ superior al 2.6%, se relaciona con respuesta óptima al tratamiento con IFN-beta (207). Así mismo, se ha descrito que los respondedores óptimos a este fármaco, presentan una expansión de células NK CD56 bright y de linfocitos T reguladores durante la terapia (208,209). Acetato de glatiramero, por su parte, produce una disminución de la expresión de CD40 en las células dendríticas, molécula asociada con un aumento de la tasa de brotes (210,211). Por otro lado, niveles elevados de emigrantes tímicos, linfocitos B transicionales, células T dobles negativas o linfocitos Th1 al inicio del tratamiento podrían identificar a los respondedores subóptimos a fingolimod (211). Al contrario, niveles elevados de células CD56 bright y plasmablastos al inicio, se relacionan con una respuesta óptima (212). En pacientes tratados con natalizumab, la disminución de CD49d en CMSP (células mononucleares de sangre periférica) disminuye su capacidad de migración y se ha relacionado con una respuesta óptima (213–215).

En cuanto a marcadores emergentes, cabe destacar a los miRNAs. Es conocido que los niveles de estas moléculas están desregulados en pacientes con EM y diversos estudios han demostrado que pueden ser restaurados por algunos tratamientos. Por ejemplo, fingolimod normaliza los niveles de miR-1156, -23a, y -223 (216), así como natalizumab los de miR-155 y miR-266 (217). IFN-beta es capaz de estimular la molécula *dicer*, precursora de miRNAs, en respondedores óptimos (218).

Actualmente, un tema importante en la investigación para establecer una terapia personalizada en la EM es la validación de estos biomarcadores en estudios multicéntricos para su implementación en la práctica clínica. En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente la validación de un método de citometría para evaluar biomarcadores de respuesta a tratamiento con IFN-beta. En este estudio, en el que se procesaron 105 muestras de sangre periférica de pacientes con EM naïve procedentes de 14 hospitales a nivel nacional, se demostró que la estandarización del método era muy dependiente del pre-establecimiento de

los parámetros de compensación y del punto de corte de los valores negativos de fluorescencia (219).

1.8.2. Biomarcadores predictores de efectos adversos.

La identificación de marcadores que detecten a los pacientes más susceptibles de desarrollar efectos adversos al tratamiento contribuye en el avance hacia una terapia personalizada con el mejor balance riesgo/beneficio.

Existen varios tratamientos con efectos secundarios graves que han sido estudiados. Natalizumab es un fármaco muy eficaz en las formas más agresivas de EM pero en aproximadamente 4/1000 tratados produce LMP, una infección oportunista grave causada por el virus JC que puede desencadenar en la muerte del paciente (220). El riesgo de desarrollar dicha infección se ha relacionado positivamente con la existencia de anticuerpos contra el virus antes del tratamiento o durante el mismo, con el uso de terapias inmunosupresoras anteriores o con una disminución de la molécula L-selectina en linfocitos T CD4+ (221–223). Por el contrario, la presencia de BOC IgM lípido específicas se asocia con un bajo riesgo de LMP (224). Las reacciones anafilactoides son otro problema derivado del uso de este fármaco y se asocian con la presencia de determinados alelos HLA DRB1 (225).

Por su parte, el tratamiento con fingolimod, aumenta el riesgo de infección herpética con riesgo de muerte, por lo que es necesario evaluar la presencia de anticuerpos frente al virus de varicela zoster y vacunar a los pacientes seronegativos antes de iniciar el tratamiento (226,227).

El uso de dimetilfumarato puede inducir linfopenia en un porcentaje no desdeñable de pacientes, con el riesgo asociado de LMP que conlleva esta situación (155). Esto hace necesario evaluar el recuento linfocitario durante el tratamiento, sobre todo en personas de edad avanzada y que hayan sido tratados con natalizumab anteriormente (228).

El uso de alemtuzumab se ha asociado con el desarrollo de autoinmunidad secundaria en un tercio de los pacientes. Estudios preliminares describieron los niveles de IL-21 séricos previos al tratamiento como posible marcador de este efecto secundario (229).

Justificación

Hipótesis y objetivos

2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO DE TESIS

En los últimos años se han aprobado diversos fármacos modificadores de la enfermedad, aumentando así rápidamente el número de terapias disponibles para el tratamiento de la EM. En esta línea cabe destacar el esfuerzo en el desarrollo de terapias de administración oral que faciliten la adherencia al tratamiento y hagan más cómoda la vida del paciente. Entre ellos se encuentran dimetilfumarato y teriflunomida, que han demostrado su eficacia en la disminución de la tasa de brotes, del número de lesiones en resonancia y de la progresión de la enfermedad en varios ensayos clínicos. Sin embargo, el efecto de ambas terapias sobre el sistema inmunológico todavía no está claro y son necesarios más estudios que pongan de manifiesto su impacto sobre las diferentes poblaciones inmunológicas.

En esta era de auge farmacológico es necesario trabajar hacia una medicina individualizada. La existencia del elevado número de terapias disponibles para el tratamiento de la enfermedad hace necesaria la descripción de herramientas capaces de identificar la opción terapéutica óptima con el mejor perfil riesgo/beneficio para un paciente concreto. Para ello es indispensable la identificación de biomarcadores de respuesta al tratamiento que permitan una monitorización del efecto del mismo.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existen datos que ponen de manifiesto que diversas terapias modificadoras del curso de la enfermedad tienen un efecto sobre la respuesta inmune y pueden ser monitorizadas mediante diferentes estrategias. La citometría de flujo constituye una buena herramienta para un seguimiento preciso y exhaustivo de la respuesta al tratamiento. Estudiamos un amplio panel de células proinflamatorias y reguladoras para caracterizar el efecto de dimetilfumarato y teriflunomida en esclerosis múltiple y explorar su papel como biomarcadores que identifiquen de manera precoz a los respondedores óptimos y contribuyan a monitorizar el tratamiento.

Así, los objetivos de esta tesis fueron:

- Identificación de cambios en subpoblaciones leucocitarias circulantes después de 6 meses de tratamiento con dimetilfumarato y teriflunomida en pacientes con EM.
- Búsqueda de biomarcadores que identifiquen de forma precoz a los respondedores óptimos a dimetilfumarato y teriflunomida en pacientes con EM.

Publicaciones

4.1. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile.

Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldán E, Picón C, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. Mult Scler. 2018; 24(10):1317-1327

Antecedentes: Dimetilfumarato es un fármaco oral aprobado para el tratamiento de las formas RR de EM, capaz de reducir la tasa de brotes hasta en un 50%, así como reducir el número de lesiones en resonancia. Su mecanismo de acción no se conoce claramente, aunque se ha descrito su papel antioxidante e inmunomodulador. Nuestro objetivo fue identificar los cambios producidos por dimetilfumarato en leucocitos sanguíneos, así como identificar los cambios asociados a una respuesta óptima.

Diseño del estudio: longitudinal, prospectivo, unicéntrico.

Pacientes: Se estudiaron 64 pacientes con EMRR tratados con dimetilfumarato durante un año. Se monitorizó el grado de progresión de la discapacidad a través de la escala EDSS, el número de brotes nuevos y la aparición de nuevas lesiones en resonancias anuales.

Métodos: Se aislaron CMSP heparinizada antes de iniciar tratamiento y 6 meses después, mediante separación en gradiente de densidad y se criopreservaron hasta su utilización. Se estudiaron subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria y reguladoras por citometría de flujo. Los ensayos se hicieron en paralelo en las muestras basales y a los 6 meses de tratamiento.

Al año de tratamiento, los pacientes se clasificaron según su actividad clínica y en resonancia. Se consideró a los pacientes como NEDA (de “no evident disease activity”) si no habían presentado brotes, aumento de EDSS, ni nuevas lesiones en resonancia durante el seguimiento. Por el contrario, aquellos que presentaron al menos una de las tres condiciones antedichas se clasificaron como ODA (de “ongoing disease activity”), es decir, pacientes con actividad de la enfermedad durante el tratamiento.

Las diferencias en las distintas subpoblaciones leucocitarias en las muestras basales y a 6 meses de tratamiento fueron analizadas mediante el test estadístico de Wilcoxon y las diferencias entre NEDA y ODA mediante el test de Mann-Whitney. Los valores de la p fueron corregidos con el test de Bonferroni.

Resultados: Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T naïve y una disminución de linfocitos de memoria efectora durante el tratamiento en todos los pacientes. Sin embargo, solo los respondedores óptimos mostraron una reducción significativa en los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central, células B de memoria, linfocitos T CD4+ productores de IFN-gamma, linfocitos T CD8+ productores de TNF-alfa e IFN-gamma y células B productoras de TNF-alfa. Además, se observó un aumento de células CD56 bright exclusivo de este grupo. Después del tratamiento se observó una correlación negativa entre las células CD56 bright y los linfocitos T CD8+ productores de TNF-alfa e IFN-gamma.

Conclusión: La respuesta óptima al tratamiento con dimetilfumarato se asoció con un cambio en el perfil inmunológico de los pacientes en el que destaca la inhibición de la respuesta inflamatoria y la inducción de células reguladoras.

Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile

Silvia Medina, Noelia Villarrubia, Susana Sainz de la Maza, José Lifante, Lucienne Costa-Frossard, Ernesto Roldán, Carmen Picón, José C Álvarez-Cermeño and Luisa M Villar

Multiple Sclerosis Journal

2018, Vol. 24(10) 1317–1327

DOI: 10.1177/
1352458517717088

© The Author(s), 2017.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Abstract

Background: The precise mechanism of action of dimethyl fumarate (DMF) treatment in MS remains unknown.

Objective: To identify the changes in the blood lymphocyte profile of MS patients predicting no evidence of disease activity (NEDA) status after DMF treatment.

Methods: We studied blood lymphocyte subsets of 64 MS patients treated with DMF at baseline and after 6 months of treatment by flow cytometry. NEDA (41 patients) or ongoing disease activity (ODA, 23 patients) were monitored after a year of follow-up.

Results: During treatment, all patients experienced an increase in the naive T cells and a decrease in effector memory ones. However, only NEDA patients showed a significant reduction in central memory CD4+ and CD8+ T cells, memory B cells, CD4+ T cells producing interferon (IFN)-gamma, CD8+ T cells producing tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and IFN-gamma and B cells producing TNF-alpha. Additionally, they had an increase in regulatory CD56bright cells not observed in ODA group. After treatment, there was a negative correlation between CD56bright cells and CD8+ T cells producing IFN-gamma and TNF-alpha.

Conclusion: A pro-tolerogenic shift in the blood leukocyte profile associates with an optimal response to DMF in MS.

Keywords: Biomarkers, dimethyl fumarate, disease-modifying therapies, immunology, multiple sclerosis, treatment response

Date received: 26 January 2017; revised: 26 April 2017; accepted: 26 May 2017

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) of unknown etiology, in which immune cells migrate to the CNS inducing demyelization and axonal damage, the main cause of disability in the disease.¹ MS affects approximately 2.5 million individuals worldwide and is the most common demyelinating disease affecting young adults. Different therapeutic options are available to ameliorate disease activity in MS patients.^{2,3} Unfortunately, the response to treatment is not always satisfactory and a number of suboptimal responders are found for every disease-modifying treatment used in MS.

Dimethyl fumarate (DMF; Tecfidera®, Biogen, Cambridge, MA) is an approved treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). The efficacy of oral DMF in treating RRMS in adults was evaluated in two large 2-year double-blind, multinational, phase III trials, DEFINE⁴ and CONFIRM⁵ and their dose-blind extension, ENDORSE.^{6,7} DMF reduces relapse rate by about 50% and both the number of new or enlarging hyperintense lesions on T2-weighted images and the number of gadolinium-enhancing lesions. DMF mechanism of action has not been fully elucidated, although it was postulated that it plays both antioxidant and immunomodulatory effects, including a reduction in cytokine production,⁸

Correspondence to:

LM Villar
Servicio de Inmunología,
Hospital Universitario
Ramón y Cajal, Ctra.
Colmenar km. 9100, 28034
Madrid, Spain.
luisamaria.villar@salud.madrid.org

Silvia Medina
Noelia Villarrubia
José Lifante
Ernesto Roldán
Carmen Picón
Luisa M Villar
Servicio de Inmunología,
Hospital Universitario
Ramón y Cajal, Madrid,
Spain; IRYCIS, Madrid,
Spain; REEM, Barcelona,
Spain

Susana Sainz de la Maza
Lucienne Costa-Frossard
Servicio de Neurología,
Hospital Universitario
Ramón y Cajal, Madrid,
Spain; IRYCIS, Madrid,
Spain; REEM, Barcelona,
Spain

José C Álvarez-Cermeño
Servicio de Neurología,
Hospital Universitario
Ramón y Cajal, Madrid,
Spain; IRYCIS, Madrid,
Spain; REEM, Barcelona,
Spain; Department of
Medicine, University of
Alcala, Madrid, Spain

in the migratory capacity of the immune cells by inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B),⁹ and the activation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transcriptional pathway.¹⁰

It was also suggested that it affects predominantly memory T and B cells and induces a shift toward anti-inflammatory response.^{11–14} However, data from immunological changes in RRMS patients treated with DMF are still sparse and more comprehensive insights on its mechanism of action are needed.

No evidence of disease activity (NEDA) is defined as the absence of new relapses, disability progression, and magnetic resonance imaging (MRI) activity on a disease-modifying treatment.¹⁵ Patients achieving NEDA in the first years of treatment have a high probability of remaining free of progression for long.¹⁶ Thus, the finding of biomarkers predicting this status at the beginning of a treatment would be very useful for therapeutic decisions.

The main goal of this study was to identify if DMF induces specific changes in blood immune cells of MS patients who will remain with NEDA the first year of treatment. This would be of relevant clinical interest and would contribute to clarify the immunological mechanisms of action of the drug.

Patients and methods

Patient demographic and clinical data

This study was approved by the ethics committee of Ramon y Cajal University Hospital, Madrid. Each patient signed a written consent before entry. A code was assigned to every patient to warrant confidentiality of collected data. We studied 64 patients diagnosed with RRMS who consecutively initiated treatment with DMF at the MS unit of Ramon y Cajal University Hospital.

Patient follow-up

Patients were examined every 3 months, with additional visits in case of relapses. Relapses were defined as a worsening of neurological impairment or an appearance of a new symptom or abnormality attributable to MS, lasting at least 24 hours and preceded by stability of at least 1 month.¹⁷ Expanded Disability Status Scale (EDSS) score was assessed at each visit. An MRI of the brain was performed within a month before treatment initiation and 1 year after starting DMF in 1.5T scanners with standard head coils (Philips Gyroscan NT, Eindhoven, Netherlands). Slice

thickness of 5 mm was acquired to obtain contiguous axial sections that covered the entire brain. The following sequences were performed: T1-weighted imaging, T1-weighted imaging with gadolinium enhancement, axial fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) T2, axial T2-weighted imaging, and axial proton density T2-weighted imaging.

Samples

Samples were collected *immediately before* treatment with DMF and after 6 months of treatment. Heparinized whole blood was collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained within 2 hours by Ficoll density gradient centrifugation (Fresenius Kabi, Norway) and cryopreserved in aliquots of $5\text{--}6 \times 10^6$ cells until studied.

Monoclonal antibodies

The following monoclonal antibodies were used in the study: CD8-FITC, CD27-FITC, interferon (IFN)-gamma-FITC, CD24-PE, CD197-PE (CCR7-PE), granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)-PE, CD3-PerCP, CD38-PE-Cy5.5, TNF-alpha-PerCP-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD25-PE-Cy7, CD45RO-APC, CD56-APC, CD4-APC-H7, CD8-APC-H7, CD3-BV421, CD127-BV421, CD45-V500 (all from BD Biosciences, San Diego, CA); interleukin (IL)-10-PE (Biolegend, San Diego, CA); and IL-17-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Labeling of surface antigens

Aliquots of 10^6 PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), stained with the appropriate amounts of monoclonal antibodies during 30 minutes at 4°C in the dark, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 300 μ L of PBS, and analyzed.

In vitro stimulation and intracellular cytokine staining

Aliquots of 10^6 PBMCs were resuspended in 1 mL of complete medium with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 750 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich), in the presence of 2 μ g/mL Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) and 2.1 μ M Monensin (Golgi Stop, BD Biosciences) in polypropylene tubes and incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO₂. To identify IL-10-producing B cells, PBMCs were preincubated with 3 μ g/mL of CpG oligonucleotide (InvivoGen, San Diego, CA) during 20 hours at 37°C with 5% CO₂.

prior to stimulation. After incubation, PBMCs were washed with PBS, resuspended in residual volume, and stained for 30 minutes at 4°C in the dark with the appropriate amounts of monoclonal antibodies recognizing the surface antigens. Then, cells were washed with PBS, fixed, and permeabilized for 20 minutes at 4°C in the dark with Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences), washed twice with Perm/Wash solution (BD Biosciences) and stained intracellularly 30 minutes at 4°C in the dark with monoclonal antibodies recognizing the following cytokines: IL-10, IFN- γ , GM-CSF-PE, TNF- α , and IL-17. After two washes, PBMCs were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

Flow cytometry

Cells were always analyzed within a maximum period of 1 hour after staining. Mean autofluorescence values were set using appropriate negative isotype controls. Data analysis was performed using FACSDiva Software V.8.0 (BD Biosciences). A gate including lymphocytes and monocytes and excluding debris and apoptotic cells was established; a minimum amount of 30,000 events were analyzed. According to the differential expression of several antigens, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were classified as: naïve (CCR7⁺ CD45RO[−]), central memory (CM) (CCR7⁺ CD45RO⁺), effector memory (EM) (CCR7[−] CD45RO⁺), and terminally differentiated (TD) (CCR7[−] CD45RO[−]). Regulatory CD4 T cells (Treg) were defined as CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low}. B cells were classified as: memory (CD19⁺ CD27^{dim} CD38^{dim}), plasmablasts (CD19⁺ CD27^{hi} CD38^{hi}), and CD27[−] regulatory cells (Breg) (CD19⁺ CD27[−] CD24^{hi} CD38^{hi}); we also explored natural killer (NK) cells (CD56^{dim} CD3[−]), natural killer T (NKT) cells (CD56^{dim} CD3⁺), and CD56^{bright} NK cells (CD3[−] CD56^{bright}). Gating strategy is shown in supplementary figure. For intracellular cytokine staining, we used two controls: isotype controls in stimulated PBMC to establish fluorescence background, and non-stimulated PBMC for quantifying basal cytokine expression. Gating strategy is shown in supplementary figure.

Statistical analysis

Statistical analyses were made using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Prism Inc, La Jolla, CA). Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6 months after treatment results; Mann–Whitney test was used to compare results in NEDA versus ongoing disease activity (ODA) group. *p*-values were corrected using Bonferroni method. Correlations were assessed by

Spearman test. *p* values below 0.05 were considered as significant.

Results

A total of 65 RRMS patients (48 females and 17 males) were included in this study. However, only 64 of them were treated with DMF during at least 1 year, since a female patient abandoned treatment due to gastrointestinal side effects. Age at disease onset was 29.4 ± 1.3 years (mean \pm standard error); disease duration at DMF initiation was 12.7 ± 1.0 years. EDSS at this point was 2.8 ± 0.2 and the annualized relapse rate in the previous 2 years 0.8 ± 0.1 . In all, 11 patients were treatment naïve, 39 received previously first-line drugs (interferon- β or glatiramer acetate), and 15 second-line drugs (natalizumab, fingolimod) or azathioprine. In all, 21 patients were previously treated with only one disease-modifying drug; 23 with two and 10 with three or more. Patients who received previous first- or second-line drugs underwent a washout period of 1 and 2 months before initiating DMF treatment, respectively.

Patients were classified according to their clinical and MRI activity after 1 year of follow-up. Those showing NEDA in terms of absence of relapses, progression in the EDSS score, or MRI activity were considered as optimal responders. To have at least one relapse, or increase of at least one point in the EDSS score confirmed in two consecutive visits, or presence of new T2 lesions or gadolinium-enhanced lesions was considered evidence of ODA. After a year on DMF treatment, 41 patients showed NEDA and 23 ODA (6 patients suffered a relapse during follow-up, 11 had new lesions in the follow-up MRI study, 5 experienced disability worsening, and the remaining one suffered a relapse and disability worsening). We only had a patient suffering a relapse in the first 3 months after treatment initiation, and we did not take this relapse into account to evaluate ODA status since it occurred in the window period when the drug has not reached its full efficacy. Baseline clinical and demographic data of patients showing NEDA or ODA are shown in Table 1. No differences were found between the two groups of patients.

No differences were observed in basal leukocyte subsets showed by the seven patients suffering a relapse within the 3 months prior to initiating DMF treatment (four suffered a relapse 3 months, other two, 2 months and the remaining one, a month prior treatment initiation; all but one received high-dose steroids) and those observed in the remaining patients.

Table 1. Clinical and demographic data of patients included in the study.

	NEDA (<i>n</i> =41)	ODA (<i>n</i> =23)	<i>p</i>
Age at disease onset (years), median (25%–75% IQR)	30.0 (21.0–39.5)	25.0 (20.0–37.0)	NS
Sex (male/female)	10/31	7/16	NS
Age at baseline (years), median (25%–75% IQR)	43.0 (37.5–49.0)	43.0 (33.3–48.5)	NS
Disease duration (years), median (25%–75% IQR)	12.6 (5.8–17.9)	9.8 (4.6–20)	NS
EDSS score at baseline, median (25%–75% IQR)	2.0 (1.5–3.5)	2.0 (1.5–3.0)	NS
Relapses in the 2 years before DMF treatment, median (25%–75% IQR)	0.5 (0.0–1.0)	1.0 (0.0–1.0)	NS
Previous treatments	7 N; 25 FL; 9 SL	4 N; 14 FL; 5 SL	NS
Number of previous treatments	7(N); 14(1); 14(2); 6(\geq 3)	4(N); 7(1); 9(2); 3(\geq 3)	NS
DMF: dimethyl fumarate; FL: prior treatment with first-line drugs; IQR: interquartile range; N: no previous disease-modifying treatment; NEDA: no evidence of disease activity; NS: not significant; ODA: ongoing disease activity; EDSS: Expanded Disability Status Scale; SL: prior treatment with second-line drugs; (1): prior treatment with one disease-modifying drug; (2): prior treatment with two disease-modifying drugs; (\geq 3): prior treatment with three or more drugs.			

Only a patient had a relapse in the 3 months before obtaining 6-month sample (at 4.5 months after initiating DMF treatment). He received high-dose steroids. However, results obtained with this patient did not alter total results.

Effector and regulatory subsets

We first studied different immune cell subsets in blood mononuclear cells obtained before and 6 months after treatment initiation in the whole group of patients (*n*=64). We found significant changes in effector, memory, and regulatory cell subsets. The percentages of total CD8 T cells, EM CD4+ and CD8+ T cells, TD CD8 T cells, NKT cells, and memory B cells decreased at 6 months of treatment with DMF, while those of CD4+ and CD8+ naive T cells and CD56bright cells increased. Results are shown in Figures 1 and 2.

We next explored the same subsets in NEDA and ODA patients. No difference in any particular subpopulation was observed between both groups prior to treatment onset (data not shown).

When we studied changes between basal and 6-month samples (Figures 1 and 2), both groups showed similar increases in naive CD4+ and CD8+ T cells and similar decreases in EM CD4+ T cells and in EM and TD CD8+ T cells during treatment. However, NEDA patients showed a distinct profile of other lymphoid subsets. They showed a clear decrease in total CD8+ T cells ($p<0.0001$), CM CD4+ and CD8+ T cells ($p=0.007$ and $p=0.014$ respectively, representative examples are shown in Figure 3), and memory B cells ($p<0.0001$). They also showed increased percentages of CD56bright

cells ($p=0.016$). No significant changes were appreciated in these subsets in ODA group.

Intracellular cytokine production

We next studied intracellular cytokine production in T and B lymphocytes (Figure 4). We found a significant decrease in the percentage of CD4+ and CD8+ IFN-gamma+ T cells, CD8+ TNF-alpha+ T cells, and CD8+ GM-CSF+ T cells after 6 months of DMF treatment in the whole group of patients. These differences were restricted in most cases to NEDA group, with the exception of CD8+ GM-CSF+ T cells, which did not show significant decrease either in NEDA or ODA groups. We also found a significant decrease in the percentages of CD19+ TNF-alpha+ B cells not observed in the whole cohort but in the NEDA group.

A representative example of the changes in cytokine-producing subsets in NEDA patients is shown in Figure 5.

We explored if treatment status prior to DMF initiation could affect basal values of the different immune cell populations included in the study. We only observed significant differences in the percentages of CD8+ cells secreting IL-10 that were increased in patients previously treated with second-line drugs compared to those treatment naive or treated with first-line drugs ($p=0.001$).

Association between regulatory and effector populations

Since we observed a considerable increase in NK CD56bright population and a clear decrease in different

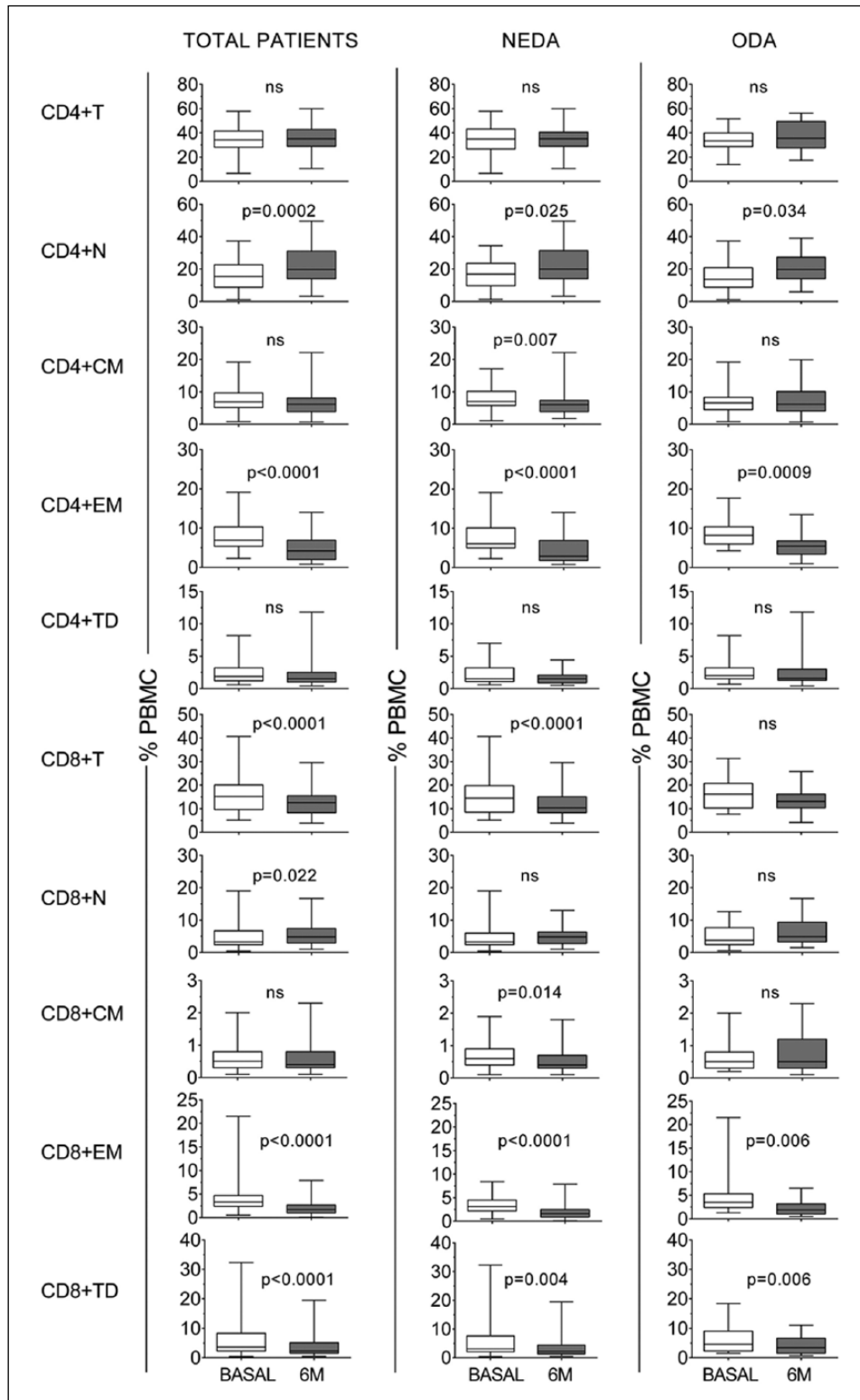


Figure 1. Percentages of peripheral blood effector and memory T lymphocyte subsets obtained before (basal) and at 6 months (6M) of dimethyl fumarate (DMF) treatment. Results of the whole group (Total) of patients ($n=64$) and of patients with no evidence of disease activity (NEDA, $n=41$) or ongoing disease activity (ODA, $n=23$) during DMF treatment are shown. Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells (median and interquartile range).

CM: central memory; EM: effector memory; N: naive; TD: terminally differentiated.

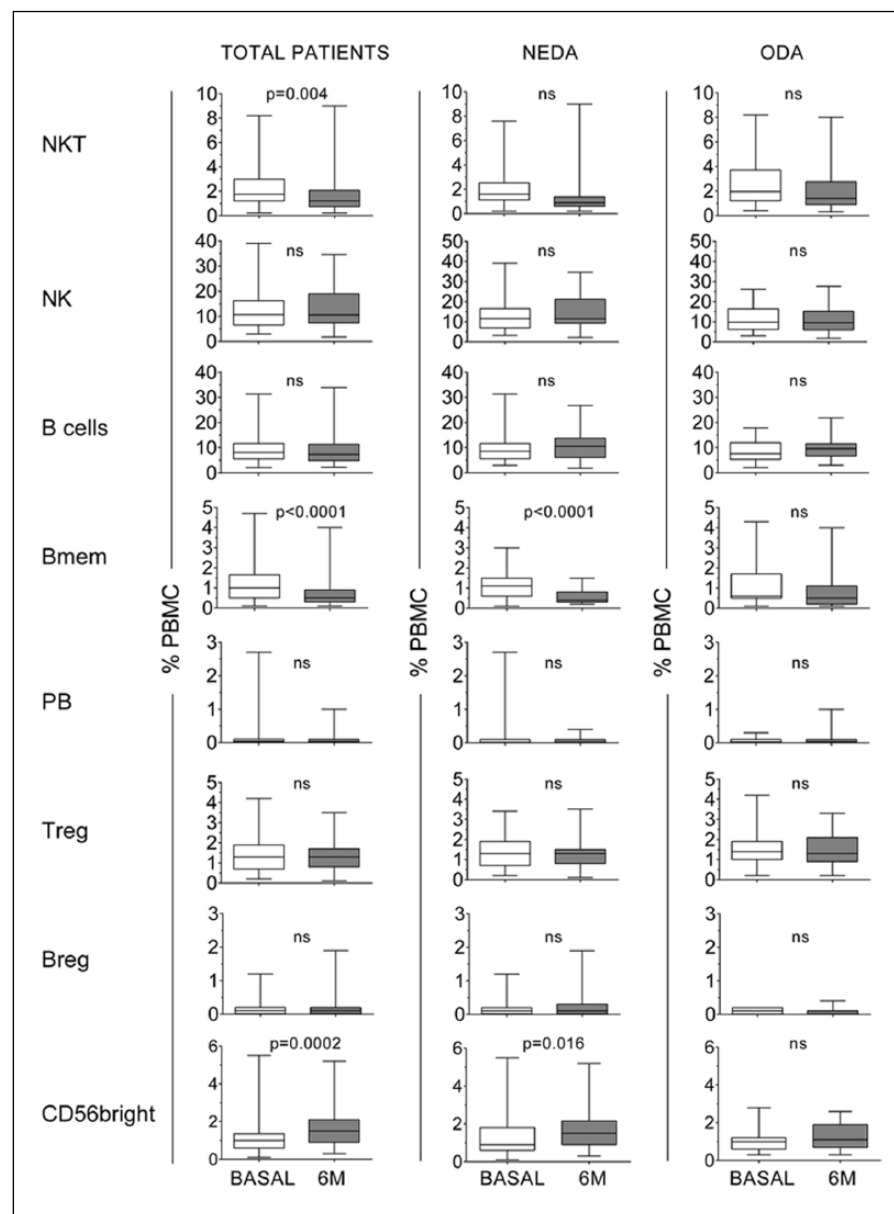


Figure 2. Percentages of peripheral blood natural killer (NK), natural killer T (NKT) cells, and NK regulatory cells (CD56bright); of total (B cells), memory (Bmem), and CD27-regulatory (Breg) B cells; of plasmablasts (PB) and of regulatory T cells (Treg) obtained before (basal) and at 6 months (6M) of dimethyl fumarate (DMF) treatment. Results of the whole group (Total) of patients ($n=64$) and of patients with no evidence of disease activity (NEDA, $n=41$) or ongoing disease activity (ODA, $n=23$) during DMF treatment are shown. Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells (median and interquartile range).

effector cells during DMF treatment, we explored the putative correlation between these regulatory cells and the effector subsets after 6 months of treatment. The clearest results were obtained with some cytokine-producing subsets. There was a negative correlation within the percentage of CD56bright cells and those of CD8+ T cells producing TNF- α ($r=-0.48$, $p<0.0001$) and IFN- γ ($r=-0.41$, $p=0.0012$) and to a lesser extent with CD4+ T cells producing IFN- γ ($r=-0.28$, $p=0.028$).

These data reveal a potential mechanism of action for DMF by upregulating CD56bright cells and inducing a secondary inhibition of pro-inflammatory effector cells. Results are shown in Table 2 and Figure 6.

Discussion

DMF is a new oral therapy recently approved for RRMS patients. Despite the proven clinical efficacy

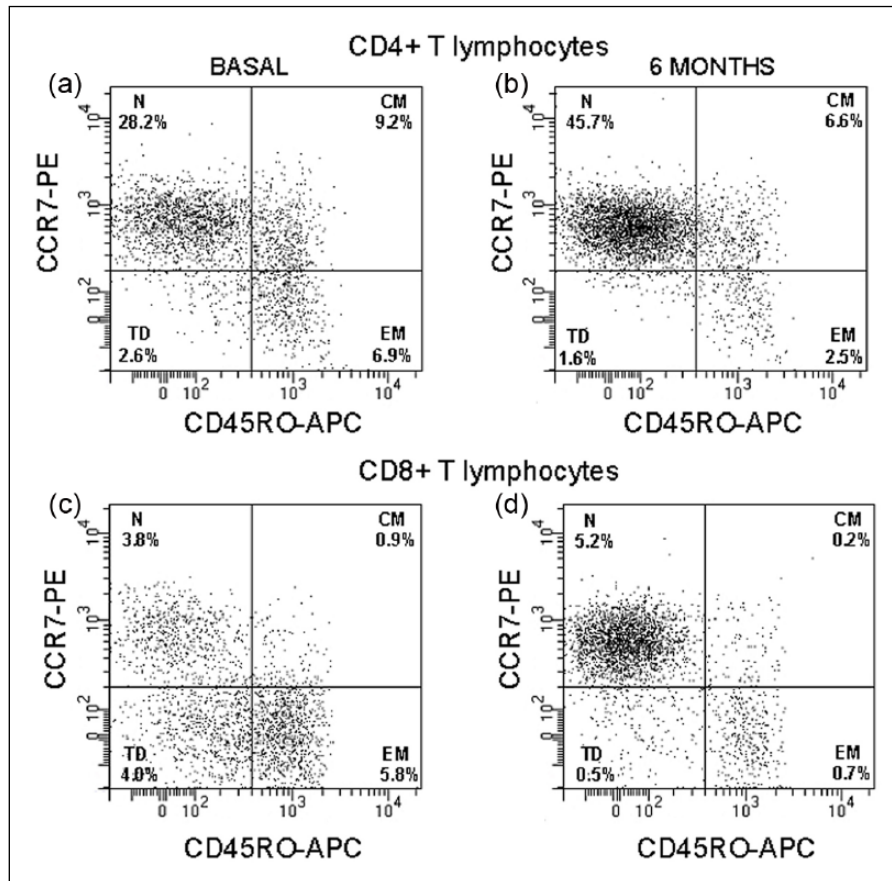


Figure 3. (a and b) CD4 T cells and (c and d) CD8 T cells from a patient with optimal response to dimethyl fumarate (DMF) at basal state (a, c, e) and after 6 months of treatment with DMF (b, d, f). Naive (N), central memory (CM), effector memory (EM), and terminally differentiated cells (TD) were studied according to their differential membrane expression of CD197 (CCR7) and CD45RO.

of this drug,^{4,5} its precise mechanism of action remains unveiled. It was postulated that its immunomodulatory effects could be mainly due to antioxidative mechanisms, but recent data suggest that the antioxidative effect of DMF may be, at least partly, a secondary phenomenon due to its immunomodulatory effect.¹⁸

Different works explored the mechanism of action of DMF by studying changes induced by this drug in peripheral blood cells in small cohorts of patients. In a cohort of 15 RRMS patients, a reduction in both CD4 and CD8 CM and EM T cells and a decrease in CD4+ cells producing IFN-gamma, TNF-alpha, and GM-CSF after 6 months of treatment was described.¹² Other exploratory study performed in a group of 13 patients described a reduction in the total number of B lymphocytes and in memory B cells.¹⁴ We aimed to further explore these changes in a bigger cohort of patients treated with DMF and to investigate the differences between patients showing NEDA or ODA

during this treatment. We included in the study 64 RRMS patients treated consecutively with DMF. We first checked possible changes in the basal lymphocyte subsets depending on previous treatments and only detected differences in regulatory CD8+ T cells, probably due to the washout period. Then, we explored differences between basal and 6-month measures and confirmed that after 6 months DMF induces a significant reduction in CD4+ and CD8+ memory and effector subsets, and in memory B cells, and an increase in CD4+ and CD8+ naive T cells. In addition, we found a significant decrease in NKT subset and a significant increase in CD56bright cells.

When analyzed separately NEDA and ODA patients, we found that the decrease in CM CD4+ and CD8+ T cells and in memory B lymphocytes was only observed in NEDA patients. Previous data showing high levels of circulating CD8+ CM T cells in MS¹⁹ suggest that these cells could play a role in the disease. In fact, depletion of CM T cells from peripheral

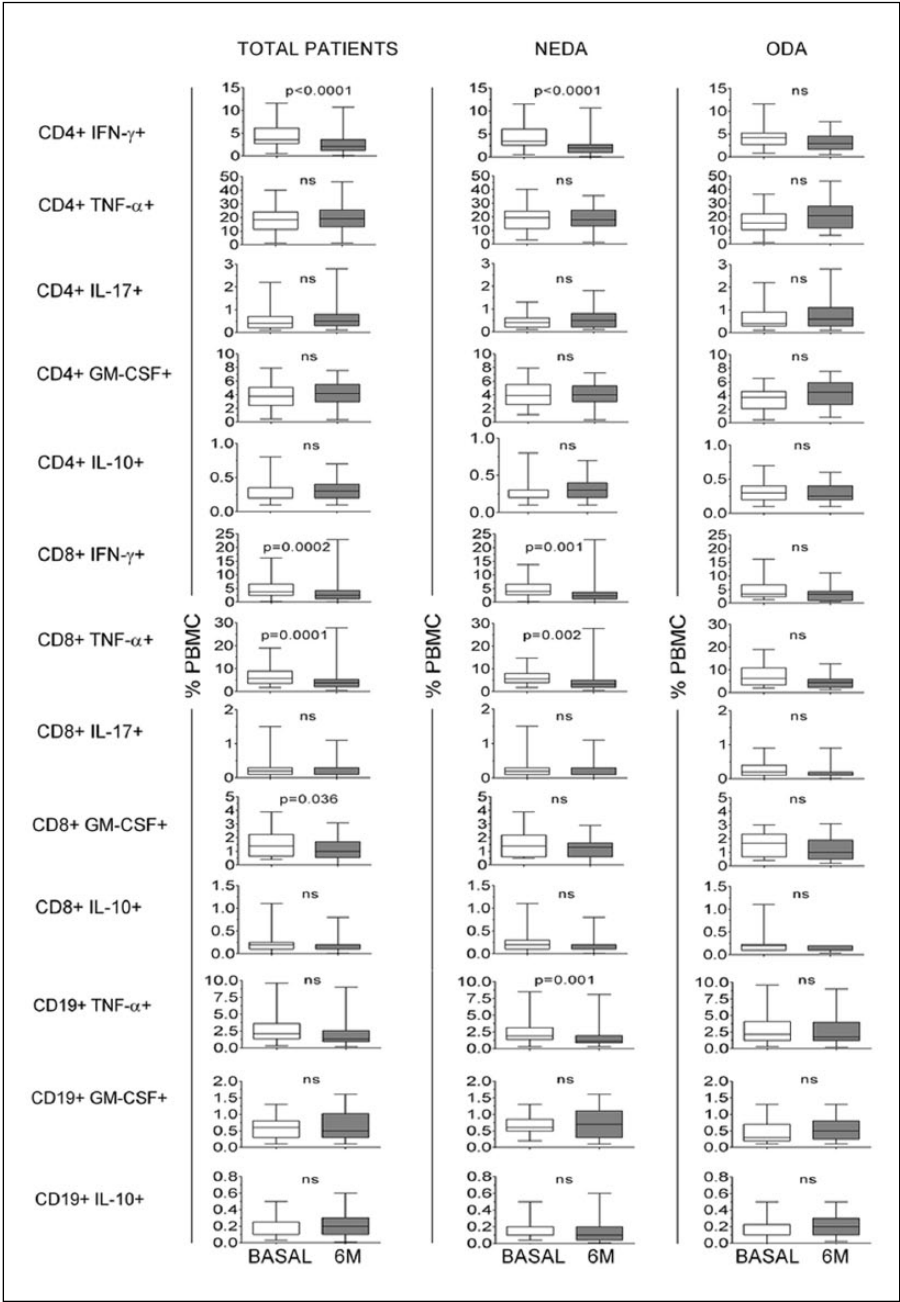


Figure 4. Percentages of peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells producing interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 17 (IL-17), granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and interleukin 10 (IL-10) and of B lymphocytes producing TNF- α , GM-CSF, and IL-10 obtained before (basal) and at 6 months (6M) of dimethyl fumarate (DMF) treatment. Results of the whole group (Total) of patients ($n=64$) and of patients with no evidence of disease activity (NEDA, $n=41$) or ongoing disease activity (ODA, $n=23$) during DMF treatment are shown. Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells (median and interquartile range).

blood is a key part of fingolimod mechanism of action.²⁰ On the other hand, the association between the decrease of memory B cells and response to treatment was previously described in other immunomodulatory treatments.²¹ Moreover, it is now known that

memory B cells are very efficacious in producing the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha²² and that this B cell subset is increased in MS.²³ These data suggest that downregulation of these cells is a key feature to achieve a complete response to DMF in MS.

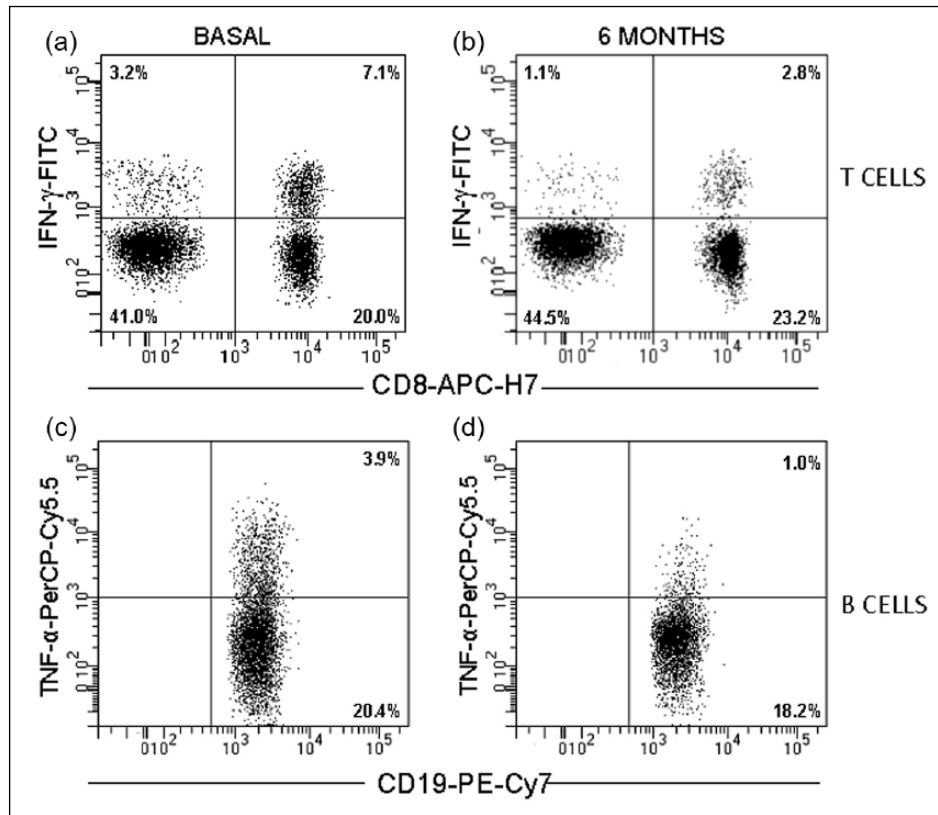


Figure 5. Dot plots showing (a and b) T cells producing interferon-gamma (IFN- γ) and (c and d) B cells producing tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) from a patient showing optimal response to dimethyl fumarate at basal state (a and c) and after 6 months of treatment with DMF (b and d). Plots a and b are gated on total T cells. Plots c and d are gated on total B cells. Percentages showed in the plots are referred to total peripheral blood mononuclear cells.

Table 2. Correlation between the percentages of lymphocytes producing pro-inflammatory cytokines and of CD56bright cells at 6 months of DMF treatment.

Effector population	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4+ IFN-gamma+	-0.2815	0.0280
CD4+ TNF-gamma+	-0.0064	0.96
CD4+ IL-17+	-0.0377	0.77
CD4+ GM-CSF+	0.2483	0.10
CD8+ IFN-gamma+	-0.4080	0.0012
CD8+ TNF-alpha+	-0.4824	< 0.0001
CD8+ IL-17+	-0.0832	0.52
CD8+ GM-CSF+	0.1271	0.41
CD19+ TNF-alpha+	-0.2296	0.08
CD19+ GM-CSF+	0.0450	0.78

DMF: dimethyl fumarate; GM-CSF: granulocyte/macrophage colony stimulating factor; IFN: interferon; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor.

different profile of cytokine production in both groups. When we investigated changes in cytokine-producing cells in the whole group of patients, we observed a clear decrease in the percentages of CD4+ IFN-gamma+, CD8+ IFN-gamma+, CD8+ TNF-alpha+, and CD8+ GM-CSF+ T cells during treatment. But, interestingly, we found that these differences were only observed in NEDA patients. In addition, a clear decrease in CD19+ TNF-alpha+ B cells, not observed in total cohort, was also observed in this group. These results are similar to that found after treatment with alemtuzumab, which induces a shift of the inflammatory response to a more tolerogenic one in MS.²⁴

We also found a negative correlation between CD56bright NK cells and various cytokine-producing lymphocyte subsets. CD56bright cells are the main cytokine producers among the NK population²⁵ and are capable of producing pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines in function of the cytokine context.²⁶ In MS, a regulatory role has been proposed for these cells. In fact, it was observed that increase of this NK cell subset closely associates with a good response to

Other interesting findings obtained when exploring NEDA and ODA patients was the increase of CD56bright NK cells observed in NEDA group and the

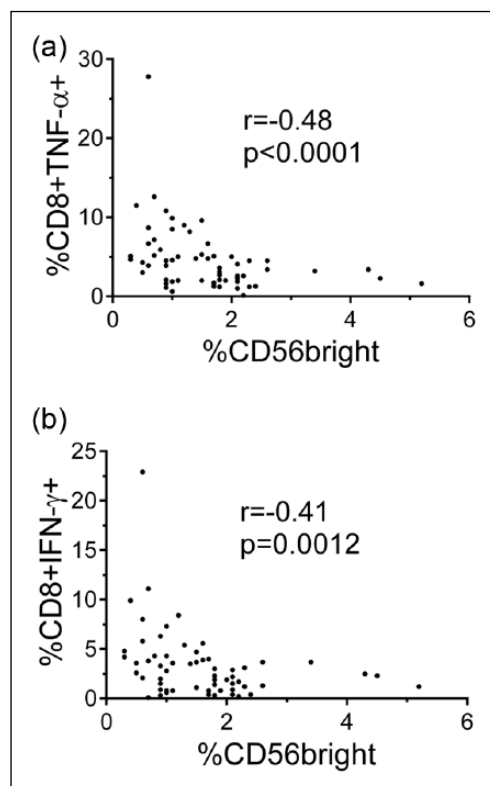


Figure 6. Scatter plots showing correlation between the percentages of CD8+ T cells producing (a) tumor necrosis factor- α (TNF- α) or (b) interferon-gamma (IFN- γ) and CD56bright cells at 6 months of treatment with DMF.

different treatments in the disease.^{27–29} Accordingly, the upregulation of CD56bright cells upon DMF treatment could inhibit effector lymphocyte subsets that are relevant in the pathogenesis of MS.

Taken together, our data show that DMF is very effective in inducing a change in the ratio between regulatory and effector circulating populations, favoring an immune regulatory response, which associates with its efficacy in improving patient course. Because of MS heterogeneity, an early and fine discrimination between optimal responders and non-responders to this treatment is crucial. These immune cell subpopulations could be candidate biomarkers for the early identification of optimal responders to DMF. Further studies with larger patient series are necessary to validate these results.

Acknowledgements

S.M. and N.V. contributed equally to this work. J.C.Á.-C. and L.M.V. were principal co-investigators.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research,

authorship, and/or publication of this article: L.M.V., L.C.-F., S.S.d.I.M., and J.C.Á.-C. received payment for lecturing or travel expenses or research grants from Merck-Serono, Biogen, Sanofi-Genzyme, Roche, Bayer, and Novartis. The remaining authors declare no conflicts of interest.

Funding


The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by grants PI15/00513 and RD12/0032/0005 from the Fondo para la Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and FEDER.

References

1. Ransohoff RM, Hafler DA and Lucchinetti CE. Multiple sclerosis—A quiet revolution. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 134–142.
2. Torkildsen Ø, Myhr KM and Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis—A review of approved medications. *Eur J Neurol* 2016; 23(suppl. 1): 18–27.
3. Wingerchuk DM and Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ* 2016; 354: i3518.
4. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1098–1107.
5. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1087–1097.
6. Gold R, Arnold DL, Bar-Or A, et al. Long-term effects of delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis: Interim analysis of ENDORSE, a randomized extension study. *Mult Scler* 2017; 23: 253–265.
7. Gold R, Giovannoni G, Phillips JT, et al. Sustained effect of delayed-release dimethyl fumarate in newly diagnosed patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: 6-year interim results from an extension of the DEFINE and CONFIRM studies. *Neurol Ther* 2016; 5: 45–57.
8. McGuire VA, Ruiz-Zorrilla Diez T, Emmerich CH, et al. Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. *Sci Rep* 2016; 6: 31159.
9. Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry

- of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002; 168: 4781–4787.
10. Wang Q, Chuikov S, Taitano S, et al. Dimethyl fumarate protects neural stem/progenitor cells and neurons from oxidative damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK pathway. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 13885–13907.
 11. Dubey D, Keiseier BC, Hartung HP, et al. Dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: Rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Rev Neurother* 2015; 15: 339–346.
 12. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, et al. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015; 3: e183.
 13. Longbrake EE, Ramsbottom MJ, Cantoni C, et al. Dimethyl fumarate selectively reduces memory T cells in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2016; 22: 1061–1070.
 14. Lundy SK, Wu Q, Wang Q, et al. Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; 3(2): e211.
 15. Giovannoni G, Turner B, Gnanapavan S, et al. Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis? *Mult Scler Relat Disord* 2015; 4: 329–333.
 16. Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, et al. Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort. *JAMA Neurol* 2015; 72: 152–158.
 17. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227–231.
 18. Michell-Robinson MA, Moore CS, Healy LM, et al. Effects of fumarates on circulating and CNS myeloid cells in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2016; 3: 27–41.
 19. Liu GZ, Fang LB, Hjelmström P, et al. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13: 149–155.
 20. Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, et al. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS ONE* 2015; 10: e0124923.
 21. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol* 2016; 94: 886–894.
 22. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007; 178: 6092–6099.
 23. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 2010; 67: 452–461.
 24. De Mercanti S, Rolla S, Cucci A, et al. Alemtuzumab long-term immunologic effect: Treg suppressor function increases up to 24 months. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; 3: e194.
 25. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146–3151.
 26. Poli A, Michel T, Thérésine M, et al. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458–465.
 27. Bielekova B, Calfamano M, Reichert-Scriver S, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5941–5946.
 28. Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2011; 141: 348–356.
 29. Saraste M, Irjala H and Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007; 28: 121–126.

Visit SAGE journals online
journals.sagepub.com/
home/msj

 SAGE journals

4.2. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients.

Medina S, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, Monreal E, Tejeda-Velarde A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019; 15;6(2):355-363.

Antecedentes: Teriflunomida es un tratamiento modificador de la enfermedad aprobado para EM. Inhibe reversiblemente a la enzima mitocondrial DHODH implicada en la síntesis *de novo* de pirimidinas. Aunque su mecanismo de acción no se conoce en su totalidad, se ha descrito su capacidad para inhibir la proliferación linfocitaria en diferentes estudios *in vitro*. Nuestro objetivo fue estudiar el impacto de este fármaco en el perfil leucocitario de pacientes con EM.

Diseño del estudio: Longitudinal, prospectivo, multicéntrico.

Pacientes: Se incluyeron 55 pacientes con EMRR que iniciaban tratamiento con teriflunomida.

Métodos: Se aislaron CMSP heparinizada antes de iniciar tratamiento y 6 meses después, mediante separación en gradiente de densidad y se criopreservaron hasta su utilización. Se estudiaron subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria y reguladoras por citometría de flujo. Además, en 7 pacientes exploramos el efecto sobre moléculas coestimuladoras y marcadores de activación, así como sobre la proliferación de linfocitos T CD4+. Los ensayos se hicieron en paralelo en las muestras basales y a los 6 meses de tratamiento. Las diferencias en las distintas subpoblaciones leucocitarias en las muestras basales y a 6 meses de tratamiento fueron analizadas mediante el test estadístico de Wilcoxon y la comparación entre pacientes de diferentes grupos mediante el test de Mann-Whitney. Los valores de la *p* fueron corregidos con el test de Bonferroni.




Resultados: Dentro del grupo de linfocitos efectores, se observó una disminución de los porcentajes de linfocitos T CD4+ terminalmente diferenciados y de plasmablastos después de 6 meses de tratamiento. Estos resultados se confirmaron con la disminución en sus números

absolutos en ambos casos. Además, observamos una disminución del marcador de activación CD69+ en los linfocitos T CD4+. Dentro del grupo de células reguladoras, se observó un claro aumento del porcentaje y número de monocitos que expresan PD-L1 que correlacionaba negativamente con el porcentaje de linfocitos T CD8+ efectores a los 6 meses. Además, el bloqueo de la molécula PD-L1, tuvo como consecuencia mayores tasas de proliferación en los linfocitos terminalmente diferenciados. Finalmente, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ y monocitos productores de IL-10.

Conclusión: Teriflunomida induce un cambio en la respuesta inmune alterada de pacientes con EM, con una reducción específica de linfocitos T y B efectores y un aumento de células inmunomoduladoras. En concreto, induce la expresión de PD-L1, una molécula involucrada en la autotolerancia.

RESEARCH ARTICLE

Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients

Silvia Medina^{1,2}, Susana Sainz de la Maza^{2,3}, Noelia Villarrubia^{1,2}, Roberto Álvarez-Lafuente^{2,4} , Lucienne Costa-Frossard^{2,3}, Rafael Arroyo^{2,5}, Enric Monreal^{2,3}, Amalia Tejeda-Velarde^{1,2} , Eulalia Rodríguez-Martín^{1,2}, Ernesto Roldán^{1,2}, José C. Álvarez-Cermeño^{2,3} & Luisa M. Villar^{1,2} 

¹Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain

²The Spanish Network of Multiple Sclerosis (REEM), Spain

³Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain

⁴Department of Neurology, Hospital Clínico San Carlos, IDISSC, Madrid, Spain

⁵Department of Neurology, Hospital Universitario Quirónsalud Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Luisa M. Villar, Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Km. 9.100, 28034 Madrid, Spain. Tel: +34913368795; Fax: +34913368809; E-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org

Funding information

This work was supported by grants FIS-PI15/00513 and RD16/0015/0001 from the Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad, Spain and FEDER funds.

Received: 5 June 2018; Revised: 16 November 2018; Accepted: 26 November 2018

doi: 10.1002/acn3.711

Abstract

Objectives: Teriflunomide, a disease-modifying treatment approved for multiple sclerosis (MS), inhibits reversibly dihydroorotate dehydrogenase, an enzyme involved in de novo pyrimidine biosynthesis and down-regulates proliferation of activated lymphocytes. We aimed to study the impact of this drug in the lymphocyte profiles of MS patients. **Methods:** Fifty-five patients with relapsing-remitting MS who initiated teriflunomide treatment were included in the study. We studied peripheral blood mononuclear cells obtained before and 6 months after treatment initiation and explored effector, memory, and regulatory cells by flow cytometry. Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6 months after treatment results. *P*-values were corrected with Bonferroni test. **Results:** When explored T and B cell subsets, we observed a decrease in the percentages of terminally differentiated CD4⁺ T cells (*P* = 0.001) and plasmablasts (*P* < 0.0001) after 6 months of treatment. These results were confirmed with the total cell number. When studied immunomodulatory cells, we observed a clear increase of monocytes expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) (*P* = 0.005), which correlated negatively with all effector CD8⁺ T cell subsets. We also observed an increase in the percentage of CD8⁺ T cells (*P* = 0.028) and monocytes (*P* = 0.04) producing IL-10. **Conclusions:** Teriflunomide induces a specific reduction in effector T and B cells that have shown to play a role in MS course and an increase in immunomodulatory cells. Particularly, this drug induces the expression of PD-L1, a molecule involved in tolerance to autoantigens, which can contribute to inhibit the abnormal immune response taking place in MS.

Introduction

Teriflunomide (Aubagio[®]) is an oral immunomodulatory disease-modifying therapy recently approved for the treatment of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS).¹ Its efficacy and safety have been demonstrated in several phase III clinical trials including TEMSO,^{2,3} TOWER,⁴ and TENERE.⁵ It produces a significant reduction in the relapse rate, disability progression, and the appearance of new lesions in magnetic resonance imaging when compared with placebo.

Teriflunomide induces a reversible inhibition of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a mitochondrial enzyme specifically required for de novo pyrimidine biosynthesis and particularly active in proliferating cells such as a lymphocytes.⁶ Although its therapeutic mode of action is not fully elucidated yet, it has been proposed that this drug produce a selective reduction of proliferating T and B cells.¹

Inhibition of adhesion molecules, cytokines, protein tyrosine kinases, nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation, and cyclooxygenase 2 activity have also been demonstrated in

some *in vitro* studies, suggesting that teriflunomide may also impact signal transduction, migration, and inflammatory processes.^{7,8}

However, the effect of teriflunomide on the immune cell profile is not fully understood. The main goal of this study was to identify if teriflunomide induces specific changes in blood immune cells of multiple sclerosis (MS) patients to further understand the effect of the drug in the abnormal inflammatory response taking place in MS.

Methods

Patients

We studied 55 patients diagnosed with RRMS who consecutively initiated treatment with teriflunomide at the MS unit of Ramon y Cajal University Hospital and Clínico San Carlos Hospital (Madrid, Spain).

This study was approved by the ethics committees of both hospitals. Each patient signed a written consent before entry. Baseline characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1.

Samples

Samples were collected immediately before initiating treatment with teriflunomide and 6 months after. Heparinized whole blood was collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained within 2 h by Ficoll density gradient centrifugation (Fresenius Kabi, Norway) and cryopreserved in aliquots of 5–6 × 10⁶ cells until studied. Blood absolute leukocyte counts were also examined at baseline and 6 months after in fresh blood samples.

Table 1. Baseline characteristics of study population (*n* = 55).

Clinical and epidemiological variables	Results
Age at baseline (years) (M ± SE)	44.7 ± 1.3
Sex (male/female)	14/41
Disease duration (months) (M ± SE)	155.1 ± 25.5
EDSS score at baseline (M ± SE)	2.4 ± 0.3
Relapses in the 2 years before treatment (M ± SE)	0.8 ± 0.1
Previous treatments	13 N; 35 FL; 7 SL
Number of previous treatments	13(N); 27(1); 7(2); 8(≥3)
Washout period (months) (M ± SE)	8.5 ± 2.3

FL: prior treatment with first line drugs; M ± SE, Mean ± Standard error; N, no previous disease-modifying treatment; SL, prior treatment with second-line drugs; (1): Prior treatment with one disease-modifying drug; (2): prior treatment with two disease-modifying drugs; (≥3): prior treatment with three or more drugs.

Monoclonal antibodies

The following monoclonal antibodies were used in the study: CD8-FITC, CD27-FITC, Interferon (IFN)-gamma-FITC, CD24-PE, CD80-PE, CD197-PE (CCR7-PE), CD3-PerCP, CD38-PE-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD25-PE-Cy7, programmed death-ligand 1 (PD-L1)-PE-Cy7, TNF-alpha-PerCP-Cy5.5, CD45RO-APC, CD56-APC, HLA-DR-APC, CD4-APC-H7, CD8-APC-H7, CD14-APC-H7, CD3-BV421, CD69-BV421, CD127-BV421, CD45-V500 (all from BD Biosciences, San Diego, CA); interleukin (IL)-10-PE (Biolegend, San Diego, CA), and IL-17-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Labeling of surface antigens

Aliquots of 10⁶ PBMC were resuspended in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), stained with the appropriate amounts of monoclonal antibodies during 30 min at 4°C in the dark, washed twice with PBS and analyzed.

In vitro stimulation and intracellular cytokine staining

Aliquots of 10⁶ PBMC were resuspended in 1 mL of Complete Medium with 50 ng/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 750 ng/mL Ionomycin (Sigma-Aldrich) in presence of 2 μg/mL Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) and 2.1 μmol/L Monensin (GolgiStop, BD Biosciences) in polypropylene tubes, and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. To identify IL-10-producing B cells, PBMC were preincubated with 3 μg/mL of CpG oligonucleotide (Invi-vogen, San Diego, CA) during 20 h at 37°C with 5% CO₂ prior to stimulation. After incubation, PBMC were washed with PBS and stained for 30 min at 4°C in the dark with appropriate amounts of monoclonal antibodies recognizing the surface antigens. Then, cells were washed with PBS, fixed, and permeabilized for 20 min at 4°C in the dark with Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences), washed twice with Perm/Wash solution (BD Biosciences), and stained intracellularly 30 min at 4°C in the dark with monoclonal antibodies recognizing the following cytokines: IFN-gamma, TNF-alpha, IL-17, and IL-10. After two washes, PBMC were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

Flow cytometry

Cells were always analyzed within a maximum period of 1 h after staining. Mean autofluorescence values were set using appropriate negative isotype controls. Data analysis

was performed using FACSDiva Software V.8.0 (BD Biosciences). A gate including lymphocytes and monocytes and excluding debris and apoptotic cells was established; a minimum amount of 30,000 events were analyzed. Gating strategy to identify the different leukocyte populations is shown in Figure S1 (S1). In addition, we followed the strategy detailed below to identify the different subpopulations. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were classified as: naïve (CCR7⁺ CD45RO[−]); central memory (CM) (CCR7⁺ CD45RO⁺); effector memory (EM) (CCR7[−] CD45RO⁺); terminally differentiated (TD) (CCR7[−] CD45RO[−]). Regulatory CD4 T cells (Treg) were defined as CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low}. B cells were classified as: memory (CD19⁺ CD27^{dim} CD38^{dim}), plasmablasts (CD19⁺ CD27^{hi} CD38^{hi}); and regulatory B cells were classified as CD19⁺ CD27[−] CD24^{hi} CD38^{hi} cells (Breg) or CD19⁺ IL-10⁺ cells. PD-L1 was explored in monocytes by studying its coexpression with CD14 in PBMC. Costimulatory and activation markers expression were analyzed on monocytes (CD80, HLA-DR), and on CD4⁺ and CD8⁺ T cells (CD69, HLA-DR).

For intracellular cytokine staining, nonstimulated PBMC and appropriate isotype controls were used. We explored intracellular production of IFN- γ and TNF- α , IL-17 and IL-10 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Intracellular IL-10 production was also assessed in CD19⁺ B cells and monocytes.

Proliferation assay

Aliquots of 10⁶ PBMC were incubated in the presence or absence of 4 μ g of anti-PD-L1 neutralizing antibody (e-Biosciences, San Diego, CA) during 4 h at 37°C with 5% CO₂. Then cells were stimulated with 1 μ g/mL of purified anti-CD3 antibody (BD Biosciences) during 72 h. CD4⁺ T cell proliferation was quantified using the BD Pharmin-gen BrdU flow kit (BD Biosciences). Briefly, cells were incubated with 3 mmol/L BrdU during 18 h, washed in saline, and stained with the appropriate amount of monoclonal antibodies for identifying CD4⁺ T cell subsets, as described above. After washing, cells were fixed and permeabilized, incubated with 30 μ g of DNase, stained with an anti-BrdU-FITC antibody, and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Statistical analyses were made using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Prism Inc, La Jolla, CA). Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6 months after treatment results. Mann–Whitney test was used to compare different groups of patients. *P*-values were corrected using Bonferroni method.

Correlations were assessed by a Spearman test. *P*-values below 0.05 were considered as significant.

Results

Fifty-five patients (14 male and 41 female) treated with teriflunomide for at least 6 months were included in the study. Baseline characteristics are shown in Table 1.

Age at treatment initiation was 44.7 \pm 1.3 (Mean \pm standard error) years and disease duration was 155.1 \pm 25.5 months. Annualized relapse rate in the previous 12 months was 0.8 \pm 0.1 and the EDSS score at baseline was 2.4 \pm 0.3. Thirteen patients were treatment naïve, 35 previously received first-line drugs (interferon- β , glatiramer acetate, or dimethyl fumarate), and seven second-line drugs (natalizumab, fingolimod, or azathioprine). Twenty-seven patients were previously treated with only one disease-modifying drug; seven with two, and eight with three or more. Patients who received previous treatments underwent a minimum washout period of a month before initiating teriflunomide treatment (Median = 3.0 months, 25%–75% IQR: 1.0–6.0 months).

Effector and immunomodulatory subsets

We explored the changes induced by teriflunomide in blood mononuclear cell counts after 6 months of treatment. Patients experienced a discrete decrease in the absolute lymphocyte counts (1908 \pm 89.9 vs. 1754 \pm 10.1; *P* < 0.0001). No patient developed lymphopenia during follow-up. We further addressed the impact of this drug on the percentages of different leukocyte subsets (Table 2 and Fig. 1). To avoid inconclusive results, we applied Bonferroni correction to all comparisons.

We first explored naïve, memory, and effector CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. Teriflunomide induced a clear decrease on TD CD4⁺ T cells after 6 months of treatment (*P* = 0.001). In addition, we explored the percentages of effector and memory B cell subsets. The only difference observed after 6 months of teriflunomide treatment was a consistent decrease of plasmablasts (*P* < 0.0001). Representative dot plots are shown in Figure 2.

When evaluated IFN- γ , TNF- α and IL-17 intracellular cytokine production by CD4 and CD8⁺ T cells, we did not find significant differences between basal and 6 months samples (data not shown).

We next studied the effect of teriflunomide in the regulatory subsets (Table 2). We found a discrete increase of monocytes (*P* = 0.044) and of CD8⁺ T cells (*P* = 0.028) producing IL-10 (Fig. 3).

We additionally explored monocytes expressing PD-L1⁺, which have shown to modulate adaptive immune

Table 2. Teriflunomide induced changes in leukocyte blood subsets.

		Percentages			Absolute numbers		
		Basal (M ± SE)	6 months (M ± SE)	P	Basal (M ± SE)	6 months (M ± SE)	P
Total patients (n = 55)							
Effector and memory subsets	CD4+T cells	34.8 ± 1.4	38.6 ± 1.5	NS			
	Naïve	21.2 ± 1.3	20.4 ± 1.3	NS			
	Central memory	9.2 ± 0.4	9.9 ± 0.5	NS			
	Effector memory	6.3 ± 0.3	6.5 ± 0.4	NS			
	Terminally differentiated	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.001	50.2 ± 4.8	42.3 ± 4.7	P < 0.0001
	CD8+T cells	14.2 ± 0.7	13.3 ± 0.9	NS			
	Naïve	5.3 ± 0.4	5.0 ± 0.5	NS			
	Central memory	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.1	NS			
	Effector memory	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	NS			
	Terminally differentiated	5.9 ± 0.7	5.2 ± 0.5	NS			
	NKT cells	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.5	NS			
	NK cells	10.1 ± 0.7	9.1 ± 0.8	NS			
	CD19+ B cells	10.1 ± 0.7	10.5 ± 0.9	NS			
	Memory B cells	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	NS			
	Plasmablasts	0.1 ± 0.01	0.05 ± 0.005	<0.0001	2.7 ± 0.3	1.2 ± 0.1	P < 0.0001
	Monocytes	18.3 ± 1.1	20.1 ± 1.4	NS			
Immunomodulatory subsets	Treg	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	NS			
	Breg	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	NS			
	CD56 ^{bright}	0.99 ± 0.1	1.15 ± 0.1	NS			
	PD-L1+ Monocytes	0.3 ± 0.04	0.6 ± 0.1	0.005	21.5 ± 2.5	33.8 ± 5.4	P = 0.01
	CD4+ IL-10+	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02	NS			
	CD8+ IL-10+	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.028	3.2 ± 0.3	4.0 ± 0.5	NS
	CD19+ IL-10+	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	NS			
	IL-10+ Monocytes	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.044	3.7 ± 0.7	5.3 ± 1.1	NS

Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells and as absolute numbers (cells/ μ L). *P*-values were corrected using Bonferroni method. Bmem, memory B cells; Breg, CD27- regulatory B cells; IL, interleukin; M ± SEM, Mean ± Standard error of mean; NK, natural killer cells; NKT, natural killer T cells; NS, not significant; PB, plasmablasts; PD-L1, programmed death-ligand 1; Treg, regulatory T cells.

responses.^{9,10} We observed a clear increase after 6 months of treatment (*P* = 0.005, Figs. 1 and 3).

We next studied if previous treatments could introduce a bias in our results by analyzing differences in basal values of the different leukocyte subsets between naïve (*n* = 13) and previously treated patients (*n* = 42). We did not find any significant differences (data not shown). We also analyzed differences between basal and 6 month samples excluding the seven patients receiving second-line drugs prior to teriflunomide. The results did not change substantially. TD CD4+ T cells, and plasmablasts decreased during teriflunomide treatment and PD-L1+ monocytes increased (*P* < 0.001 in all cases).

We explored if significant data also corresponded with variations in the total cell numbers. Our results confirmed the decrease of TD CD4+ T cells (50.2 ± 4.8 cells/mL vs. 42.3 ± 4.7 cells/mL; *P* < 0.0001) and plasmablasts (2.7 ± 0.3 cells/mL vs. 1.2 ± 0.1 cells/mL; *P* < 0.0001). We also confirmed the increase of PD-L1+ monocytes (21.5 ± 2.5 cells/mL vs. 33.8 ± 5.4 cells/mL; *P* = 0.01). Results are shown in Table 2 and Figure 1.

Effect in costimulatory and activation markers and on CD4+ T cell proliferation

To deepen into the effect of teriflunomide in immune cells, we also explored costimulatory and activation molecules in monocytes and T lymphocytes of seven of the studied patients, before and after 6 months of teriflunomide treatment. No differences were observed in CD80 and HLA-DR expression by monocytes or in HLA-DR expression in T cells, but a clear decrease in mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 was found in CD4+ T cells after treatment (*P* = 0.03, Fig. 4).

As PD-L1 acts as an immunomodulatory receptor, we investigated if this molecule could have an influence in the reduction of TD CD4+ T cells. We studied this in PBMC of seven MS patients obtained prior to initiating teriflunomide treatment. Cells were stimulated with anti-CD3, in the presence or absence of a neutralizing anti-PD-L1 antibody. Proliferation of the different T cell subsets was explored. We found higher percentages of proliferating TD CD4+ T cells when incubated with anti-PD-L1 antibody (Median = 30.3;

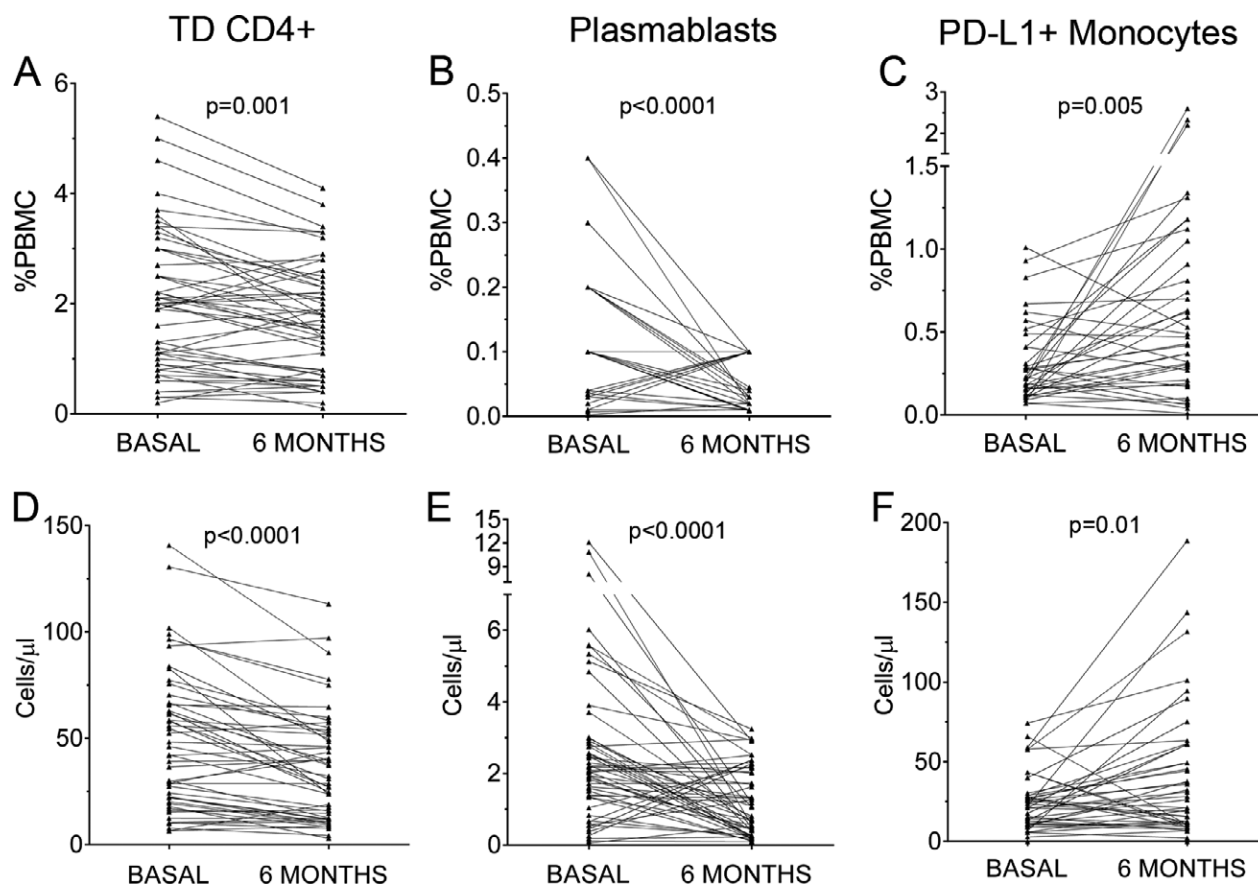


Figure 1. Percentages (A, B, C) and absolute cell counts (D, E, F) of terminally differentiated (TD) CD4+ T cells (A, D), plasmablasts (B, E) and PD-L1+ monocytes (C, F) obtained before (basal) and at 6 months of teriflunomide treatment ($n = 55$). Percentages are referred to total peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

25%–75% IQR: 15.4–43.0) than in control samples (Median = 21.4; 25%–75% IQR: 14.1–35.6; $P = 0.03$).

Association between immunomodulatory and effector populations

We explored the putative correlation between immunomodulatory and effector subsets after 6 months of treatment. There was a positive correlation within the percentage of CD8+ IL-10+ T cells and those of CD4+ IL-10+ T cells ($r = 0.44$, $P = 0.01$) and CD19+ IL-10+ B cells ($r = 0.53$, $P < 0.0001$). We also found modest negative correlations between PD-L1+ monocytes and the effector CD8+ T cells. The ratios (r) were: -0.37 for CM cells ($P = 0.01$), -0.39 for EM ones ($P = 0.01$), and -0.36 for TD subset ($P = 0.02$). Results are shown in Figure 5.

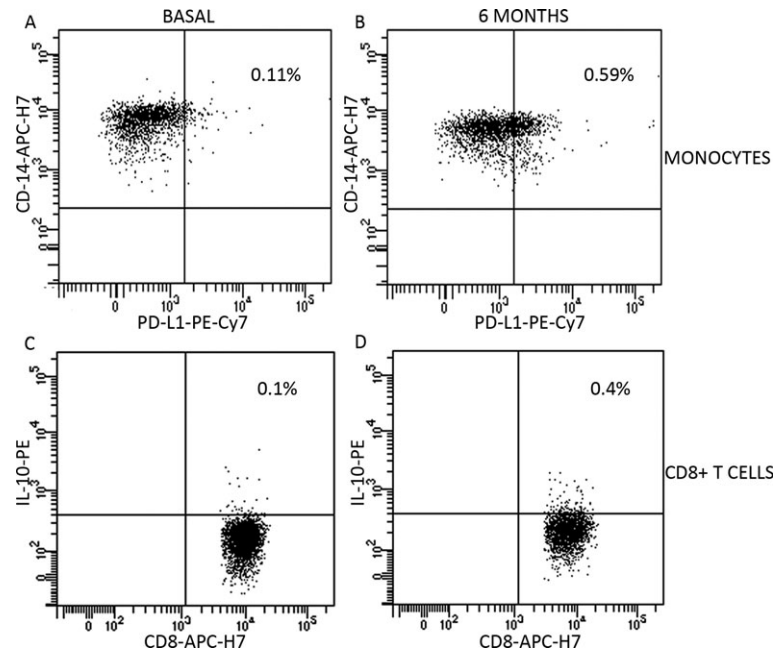
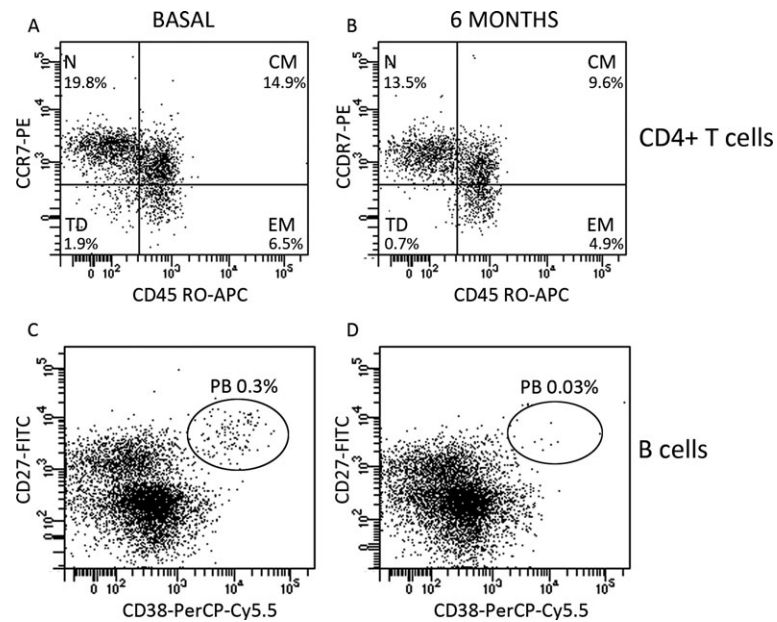
Discussion

Teriflunomide is an inhibitor of DHODH that ameliorates multiple sclerosis course by reducing activation-

induced proliferation of lymphocytes, which is highly dependent on the de novo pyrimidine synthesis.⁶ It is the active metabolite of leflunomide, a disease-modifying antirheumatic drug. However, the changes in the different immune cell subsets induced by this treatment have not been totally identified yet. Most works were made with leflunomide in vitro and in animal models. This molecule causes cell cycle arrest in early S phase without inducing apoptosis,¹¹ impedes formation of the immune synapses,¹² and decreases the release of Th1 cytokines.^{13,14} In vitro studies also showed that teriflunomide inhibits lymphocyte proliferation, without inducing cytotoxicity and significantly decreased the release of proinflammatory cytokines from activated monocytes.⁸

Less is known on teriflunomide-induced changes in lymphocyte profiles of MS patients. In a small cohort of seven RRMS patients, it was described a reduction in the number of total, mature and regulatory B cells.¹⁵

In this work we deepened into the mechanism of action of teriflunomide by studying a wider array of leukocytes including different T, B, and monocyte



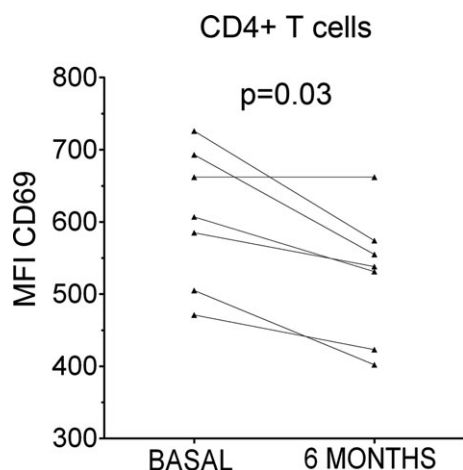


Figure 4. Expression of CD69 on CD4+ T cells. We observed that CD69 expression on CD4+ T cells measured as the mean fluorescence intensity (MFI) is reduced after 6 months of teriflunomide treatment (6 months) when compared with results of samples obtained before treatment (basal) ($n = 7$).

subsets in a cohort of 55 RRMS treated with teriflunomide. We explored changes induced by this treatment by comparing results obtained in basal and 6 month

samples. First we observed that teriflunomide treatment induces a significant decrease in the percentages and total cell counts of TD CD4+ T cells and in plasmablasts. Terminally differentiated T cells are home to peripheral tissue where they pursue their effector functions such as secretion of proinflammatory cytokines.¹⁶ In addition, the percentage of plasmablasts, a highly differentiated, antibody secreting B cell subset, is elevated in the blood of MS patients since the first clinical presentation of the disease and correlates with disease activity.¹⁷ The decrease of both effector cell subsets under teriflunomide treatment may contribute to the beneficial effect of the drug.

We did not find changes in Th1 and Th17 cytokines upon teriflunomide treatment. The main effect of this drug is observed in TD CD4+ T cells, which represent normally less than 10% of total CD4+ T cells. This may be a reason by which these differences are not appreciated. However, TD cells are important, since they are the main cells migrating to inflamed tissues upon inflammation.¹⁶

Other data indicating the effect of teriflunomide in T cell activation is the decrease induced by this treatment in

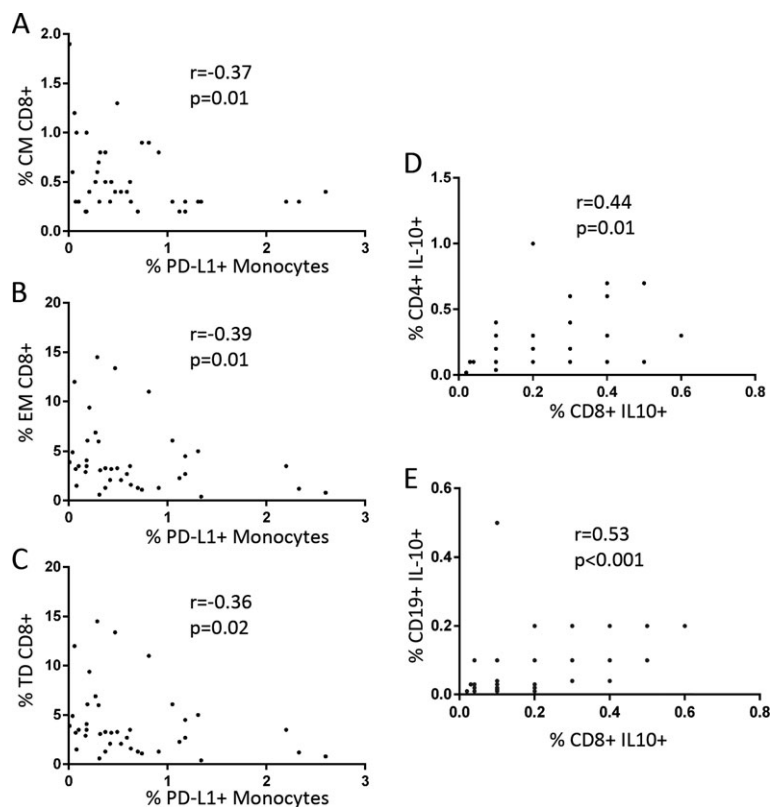


Figure 5. PD-L1+ monocytes show negative correlation with central memory (CM, A), effector memory (EM, B) and terminally differentiated (TD, C) CD8+ T cells. CD8+ IL10+ T cells correlate positively with CD4+ IL10+ T cells (D) and CD19+ IL10+ B cells (E).

the expression of CD69, which is up-regulated by CD4+ T cells upon activation.¹⁸

When studied immunomodulatory populations, we observed an increase in the percentages of CD8+ T cells and monocytes producing IL-10 after 6 months of treatment. Our results agree with *in vitro* results obtained with leflunomide, an analog of this drug, which showed an increase in IL-10 production by T lymphocytes.¹³ Interestingly, the values of CD8+ IL-10+ T cells correlated in 6 month samples with that of monocytes and CD19+ cells producing IL-10, which suggests that this drug can induce a bias toward a tolerogenic response.

In addition, we observed an increase in monocytes expressing PD-L1+. PD-L1 is a ligand of PD-1, a cell surface receptor with an important role in down-regulating the immune system and promoting self-tolerance by suppressing T cell inflammatory activity.⁹ The interaction between PD-1/PD-L1 induce inhibition of T cell proliferation, cytokine production, and cytolytic activity.¹⁰ PD-1-deficient animals develop diverse autoimmune conditions^{19,20} and its blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis model increase disease severity.^{21,22} PD-1/PD-L1 axis represents a checkpoint to control immune responses and its up-regulation in monocytes can be important to modulate the abnormal response in MS.

In our series, PD-L1 overexpression could contribute to down-modulate TD CD4+ T cells. When incubated PBMC of our patients with anti-PD-L1 neutralizing antibodies, we observed an increase in the proliferation of these cells.

In junction, our results support previous data describing that MS may associate with defective T regulatory responses and that up-regulation of these cell subsets may associate with a more benign disease course.^{23,24}

The main limitation of our study was the low number of treatment naïve patients ($n = 13$). Patients were consecutively recruited, thus reflecting real life data in our setting. However, we ruled out the putative effects of prior treatments by excluding patients treated with second-line drugs from the analysis and by comparing basal data of patients receiving or not receiving previous treatments. These analyses showed that our data did not change substantially with prior treatments, probably due to the washout period.

In summary, we observed that teriflunomide induces a shift in the abnormal response taking place in MS. It targets specifically terminally differentiated cells and induces a regulatory status in the innate immune response. These data contribute to ascertain the mechanism of action of this drug.

Author Contributions

SM, NV, and ATV collected and stored blood samples and performed the experiments. SM wrote the manuscript

draft. ERM, and ER supervised flow cytometry studies. RAL, RA, SSM, LCF, EM and JCAC visited MS patients and collected clinical data. All authors read and approved the final manuscript. LMV designed and supervised the study and corrected the manuscript.

Acknowledgments

Authors acknowledge MA Fernández de Pablos and S Ortega for their excellent technical support and A Muriel for his help with the statistical analyses. This work was supported by grants FIS-PI15/00513 and RD16/0015/0001 from the Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad, Spain and FEDER funds.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Bar-Or A. Teriflunomide (Aubagio®) for the treatment of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2014;262:57–65.
2. Miller AE, O'Connor P, Wolinsky JS, et al. Teriflunomide Multiple Sclerosis Trial Group. Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMSO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:1625–1632.
3. Wolinsky JS, Narayana PA, Nelson F, et al. Magnetic resonance imaging outcomes from phase III trials of teriflunomide. *Mult Scler* 2013;19:1310–1319.
4. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2014;13:247–256.
5. Vermersch P, Czlonkowska A, Grimaldi LM, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler* 2014;20:705–716.
6. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 2014;74:659–674.
7. Fragoso YD, Brooks JB. Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015;8:315–320.
8. Li L, Liu J, Delohery T, et al. The effects of teriflunomide on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *J Neuroimmunol* 2013;265:82–90.
9. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:203–220.

10. Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002;32:634–643.
11. Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, et al. The immunomodulatory drug leflunomide inhibits cell cycle progression of B-CLL cells. *Leukemia* 2008;22:635–638.
12. Zeyda M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. Disruption of the interaction of T cells with antigen-presenting cells by the active leflunomide metabolite teriflunomide: involvement of impaired integrin activation and immunologic synapse formation. *Arthritis Rheum* 2005;52:2730–2739.
13. Korn T, Magnus T, Toyka K, Jung S. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide-mechanisms independent of pyrimidine depletion. *J Leukoc Biol* 2004;76:950–960.
14. Dimitrova P, Skapenko A, Herrmann ML, et al. Restriction of de novo pyrimidine biosynthesis inhibits Th1 cell activation and promotes Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2002;169:3392–3399.
15. Gandoglia I, Ivaldi F, Laroni A, et al. Teriflunomide treatment reduces B cells in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017;4:e403. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000403>.
16. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, et al. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43:2797–2809.
17. Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, et al. Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 2017;133:43–60.
18. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005;26:136–140.
19. Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11:141–1517.
20. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001;291:319–322.
21. Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, et al. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2007;182:124–134.
22. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, et al. Critical role of the Programmed Death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2003;198:71–78.
23. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:625–638.
24. Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, et al. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 2011;186:3317–3326.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Representative gating strategy for flow cytometry analysis.

Discusión

La EM es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa que afecta al SNC. Es heterogénea, multifactorial y mediada por el sistema inmunológico en una compleja red de interacciones génicas y ambientales.

Se ha demostrado que la administración temprana de tratamientos modificadores de la enfermedad es importante para reducir el riesgo de progresión de la misma (230–232). El elevado número de terapias existentes hoy día requiere de una terapia individualizada atendiendo al curso de la enfermedad, a la eficacia del fármaco y a su seguridad, así como a las preferencias del paciente (233). Las variaciones de carácter individual existentes entre los pacientes hacen que sea importante identificar los mecanismos de acción asociados a los diferentes tratamientos, así como biomarcadores que predigan de modo precoz la respuesta de cada paciente a los distintos tratamientos para así poder elegir la opción terapéutica óptima.

Se dispone de dos grandes líneas de actuación terapéutica, el escalado y la inducción (234,235). El escalado, la estrategia dominante, consiste en comenzar el tratamiento con un fármaco seguro y de moderada eficacia (primera línea) como IFN-beta, acetato de glatiramer, teriflunomida o dimetilfumarato. En los pacientes que presenten efectos adversos, se procederá a cambiar a otro fármaco de este grupo; mientras que en los pacientes que continúen con una enfermedad activa durante el tratamiento, se cambiará a fármacos más eficaces. Uno de los principales problemas del escalado es la inercia terapéutica, que puede conducir a un cambio tardío manteniendo al paciente con un tratamiento inadecuado. Además, el escalado también puede llevar a un cambio precoz que agote el arsenal terapéutico rápidamente sin aprovechar los beneficios de cada terapia.

Por otra parte, la estrategia de inducción consiste en empezar con los tratamientos de alta actividad (alemtuzumab, ocrelizumab, natalizumab) basándose en la idea de que un tratamiento rápido de alta eficacia previene la acumulación de daño irreversible en el SNC. Esta inmunointervención drástica se reserva para los pacientes con factores pronósticos negativos y

permite una rápida reducción de la inflamación con un cambio a unas condiciones más tolerogénicas, que en algunos casos podrían ser mantenidas con otras terapias menos agresivas. Sin embargo, la principal razón por la que los fármacos más efectivos se relegan a las segundas y terceras líneas de tratamiento, es su riesgo elevado de efectos secundarios graves o la falta de experiencia en la clínica diaria, como es el caso de alemtuzumab. En este sentido, la EMA ha emitido una alerta temporal restringiendo su uso a tercera línea hasta que no se investiguen los nuevos efectos adversos que muestra este fármaco. Por todo ello, es indispensable evaluar el beneficio/riesgo de forma individualizada en cada terapia (236).

Por lo tanto, los biomarcadores capaces de predecir la respuesta antes del inicio del tratamiento serían de gran utilidad en el proceso de elección del fármaco, aunque su descripción es altamente complicada. Además de estos, aquellos biomarcadores capaces de evaluar el estado del paciente durante el tratamiento juegan un papel muy importante. Diversos biomarcadores que monitorizan la enfermedad están siendo evaluados como pueden ser los neurofilamentos en suero o LCR (237,238) y la tomografía de coherencia óptica (OCT) (239). Sin embargo, la RM con contraste constituye, junto con la clínica, la única herramienta utilizada actualmente en la práctica para evaluar la actividad de la enfermedad (240). Es capaz de identificar la aparición de lesiones nuevas y su realización regular es recomendada para valorar la eficacia del tratamiento. También puede medir la atrofia cerebral, si bien esta medida es compleja y sólo está implantada en un número reducido de centros a nivel asistencial. A pesar de las ventajas que presenta el seguimiento mediante esta prueba, el efecto a largo plazo del gadolinio administrado como contraste durante la RM está bajo investigación ya que se han visto depósitos de esta sustancia en ganglios basales y núcleo dentado de pacientes sometidos a resonancias seriadas (241). Además, la frecuencia de resonancias en la práctica clínica suele ser anual, lo que no permite la identificación precoz de buenos o malos respondedores y contribuye a la inercia terapéutica.

Se sabe que los leucocitos de sangre periférica juegan un importante papel en la patogenia de la enfermedad y que son un reflejo de lo que ocurre en el SNC sin necesidad de usar técnicas invasivas. También se ha demostrado que los tratamientos inmunomoduladores pueden alterar el número y porcentaje de estas células, así como la expresión de diferentes antígenos o su funcionalidad. Por todo ello, el análisis de CMSP por citometría de flujo puede contribuir a la descripción de nuevos biomarcadores.

Para la monitorización de la enfermedad durante el tratamiento se acepta que la actividad puede ser evaluada mediante la combinación de datos clínicos y paraclínicos (242). El respondedor óptimo conocido por las siglas en inglés NEDA se clasifica gracias a datos de resonancia magnética que no evidencien nuevas lesiones en T2 ni captantes de contraste, y por datos clínicos que apoyen la ausencia de brotes y de aumento de discapacidad medida mediante la escala EDSS (243). Este estado, conocido como NEDA 3, ha sido utilizado como forma de evaluación en diversos ensayos clínicos y estudios observacionales. En ellos se ha visto que, aunque una gran proporción de pacientes mantienen NEDA durante el primer o segundo año de tratamiento, muy pocos lo mantienen durante muchos más años con las nuevas terapias (244,245). Además, la valoración de la atrofia cerebral (NEDA 4) hace que disminuyan aún más los pacientes que se mantienen en esta categoría a los dos años (246). Debido a ello y para no agotar el arsenal terapéutico de modo precoz, actualmente se está considerando el MEDA (*Minimal disease activity*) que permite una mínima actividad de la enfermedad durante el tratamiento que no altere la evolución a largo plazo de los pacientes (247). Sin embargo, todavía queda por establecer qué actividad se considerará permisible en estudios longitudinales. En cualquier caso, el NEDA 3 se ha considerado una buena herramienta para la identificación de buenos respondedores a un fármaco.

Nuestro estudio consistió en evaluar el efecto de dos fármacos orales aprobados para el tratamiento de las formas RR de EM, dimetilfumarato y teriflunomida, sobre poblaciones circulantes del sistema inmunitario que han demostrado su implicación en la patología.

El estudio de biomarcadores de eficacia al tratamiento en la EM es un tema de la máxima actualidad en la investigación de esta enfermedad. Sin embargo, prácticamente no existen biomarcadores implementados hoy día en la práctica clínica. Uno de los motivos es el estudio de cohortes muy pequeñas de pacientes que conlleva niveles de significación muy ajustados haciendo muy complicada la aplicación del test de Bonferroni y su validación posterior. Para minimizar el problema de las comparaciones múltiples y aumentar el rigor, todas las comparaciones realizadas en nuestro estudio se corrigieron por el test de Bonferroni. Si bien esto redujo el número de variables que cambiaban significativamente durante el tratamiento, consideramos que aumentó la posible validez de las mismas como biomarcadores de respuesta al tratamiento. Esto no se ha hecho en otros estudios de biomarcadores de respuesta a dimetilfumarato o teriflunomida (248–250). Además, en el caso de teriflunomida, donde las variaciones que observamos son muy pequeñas, verificamos los resultados con los números absolutos de las poblaciones correspondientes.

Otros factores que influyen en la ausencia de biomarcadores aplicados en la práctica clínica son el efecto de tratamientos suministrados previamente, el uso de corticoides o la influencia de los brotes, que a menudo no se tienen en cuenta. En nuestros dos estudios investigamos el posible efecto derivado de los tratamientos anteriores y de los brotes comparando el estado basal de los pacientes en función del tratamiento previo y de la proximidad a un brote. En el caso de dimetilfumarato, no se observaron diferencias en cuanto a la proximidad de un brote, pero si vimos que los pacientes que habían sido tratados previamente con fármacos de segunda línea (fingolimod o natalizumab) mostraban valores mayores de linfocitos T CD8+ reguladores que los pacientes sin tratamiento previo o tratados con fármacos de primera línea. Esto no se había

observado en estudios previos probablemente por el bajo número de casos estudiados (248). No observamos otras diferencias significativas dependientes del tratamiento previo en los valores iniciales de subpoblaciones leucocitarias. La mayoría de los pacientes del estudio con teriflunomida habían sido tratados con fármacos de primera línea y no observamos diferencias entre ellos y los pacientes sin tratamiento previo. Aunque el bajo número de pacientes sin tratamiento previo pueda parecer una limitación, constituye un buen ejemplo de lo que ocurre en la práctica clínica real, en la que los pacientes están sujetos con frecuencia a cambios de tratamiento.

El presente trabajo muestra las variaciones inducidas por estos dos fármacos en subpoblaciones de linfocitos T que se han considerado durante muchos años como protagonistas de las fases iniciales de la enfermedad. Estudiamos linfocitos T CD4+ y CD8+ naïve y efectores identificados mediante marcadores de superficie, así como mediante la producción intracelular de citocinas proinflamatorias. Además, estudiamos poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ con fenotipo regulador cuya alteración también se ha postulado como mecanismo subyacente en la enfermedad. Los linfocitos T CD4+ reguladores los identificamos tanto con marcadores de superficie como mediante la producción de IL-10 intracelular. Esta última condición fue la elegida para el estudio de los linfocitos T CD8+ reguladores. Dentro de los linfocitos B, cuyo protagonismo ha aumentado en los últimos años con la eficacia de las nuevas terapias que los usan como diana, estudiamos las subpoblaciones de células de memoria, de plasmablastos y de células reguladoras, también identificadas por marcadores de superficie o por la producción de IL-10. También estudiamos la producción de citocinas proinflamatorias por parte de estas células cuya concentración se ha visto incrementada en LCR y sangre de pacientes con EM. Para terminar de estudiar la población linfoide, incluimos el estudio de distintas subpoblaciones de células NK. Como población representativa del linaje mieloide incluimos el estudio de monocitos sanguíneos, cuya participación en la enfermedad también es conocida.

Tras identificar las variaciones en estas poblaciones por efecto de estos tratamientos, estudiamos si alguna de ellas era capaz de identificar a los respondedores óptimos.

5.1. Estudio con dimetilfumarato en pacientes con EMRR

Dimetilfumarato es un fármaco aprobado para el tratamiento de la EMRR que forma parte de los últimos avances en el desarrollo de terapias de administración oral. Ha demostrado su eficacia en diversos ensayos clínicos de fase III (153,154). Es un fármaco relativamente seguro, aunque se ha visto un riesgo de desarrollar linfopenia grado 3 en alrededor de un 6% de los pacientes (153). Predecir esto es importante porque, aunque el número de LMPs en pacientes tratados con dimetilfumarato es muy bajo, su aparición se ha asociado con linfopenia de grado 3 mantenida (156,157). Este fenómeno se asocia con una mayor edad y un recuento más bajo de linfocitos al inicio del tratamiento. Recientemente nuestro grupo ha descrito que una disminución de más del 38% del número de linfocitos al cabo de tres meses de tratamiento se asocia a un mayor riesgo de linfopenia grado 2-3 durante el mismo (251). En concreto, la linfopenia se asocia con una disminución de linfocitos CD8+ y de células NKT en nuestra cohorte.

Aunque el mecanismo de acción no se comprende en su totalidad, en los últimos años se han hecho grandes progresos en su descripción. Diversos estudios inmunológicos han demostrado efectos sobre el número y frecuencia de diferentes subpoblaciones, así como sobre su funcionalidad. Los primeros estudios publicados exploraban su acción sobre células de sangre periférica en pequeñas cohortes de pacientes. En uno de ellos, se observó una reducción de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central y efectora, así como una disminución en la producción de IFN-gamma, TNF-alfa y GM-CSF después de 6 meses de tratamiento en un grupo de 15 pacientes (252). En el otro estudio exploratorio realizado en 13 pacientes, se describió una reducción en el número de linfocitos B totales y de memoria (253). Estos estudios aportaron luz al mecanismo de acción del fármaco, pero estaban limitados por el bajo número de pacientes incluidos en los mismos. Esto así mismo impedía encontrar diferencias entre respondedores y

no respondedores. A continuación, *Longbrake y colaboradores (cols.)* publicaron a mediados de 2016 un trabajo en el que comparaban 41 pacientes de EM tratados con el fármaco durante al menos 6 meses con 17 pacientes sin tratar (248). Observaron que se producía una disminución de linfocitos T de memoria central y memoria efectora, mientras que las células naïve aumentaban. No vieron alteración en las células NK CD56 bright, pero sí en las CD56 dim, en las que observaron una disminución. Este trabajo, aunque realizado en un mayor grupo de pacientes que los anteriores, muestra algunas limitaciones. Así, no hace un estudio longitudinal de los cambios inducidos por dimetilfumarato, sino que compara dos grupos de pacientes tratados y sin tratar, lo que puede restar exactitud a la comparación. Además, su estudio se limitó a explorar las poblaciones de linfocitos T y NK. Para confirmar los estudios previos y ampliar el número de poblaciones exploradas, comenzamos a recoger muestras de sangre periférica de los pacientes desde el inicio del tratamiento con este fármaco en nuestro hospital en julio de 2014. Finalizamos el estudio en diciembre de 2016 cuando teníamos recogidos datos clínicos y radiológicos de evolución a un año y muestras antes del inicio del tratamiento y 6 meses después de mismo, de 64 pacientes tratados con dimetilfumarato. De esta forma pudimos monitorizar los cambios inducidos por el fármaco en cada paciente e identificar los mismos con la respuesta clínica al dimetilfumarato. Utilizamos el estado NEDA 3 para identificar a los respondedores óptimos, de forma que 41 pacientes mostraron este fenotipo tras un año de tratamiento, constituyendo un número adecuado para realizar el estudio de biomarcadores.

En primer lugar, exploramos las diferencias al inicio del tratamiento y tras 6 meses del mismo en el grupo total de pacientes y en los grupos NEDA y ODA.

Los linfocitos T CD4+ totales no se modificaron por el tratamiento en ninguno de los grupos, mientras que los T CD8+ disminuyeron significativamente en el grupo total de pacientes. Dicha disminución se mantenía exclusivamente en el grupo NEDA al dividir a los pacientes en los dos grupos, evidenciando un efecto restringido a los respondedores óptimos. El efecto preferencial

de dimetilfumarato sobre los linfocitos T CD8+ está bien caracterizado en diversos estudios. Diferentes grupos han demostrado un efecto preferente del fármaco por linfocitos T CD8+, con un aumento del cociente CD4+/CD8+ como consecuencia (254,255). Sin embargo, el efecto específico en respondedores óptimos no se ha descrito en otros trabajos.

Cuando estudiamos las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ observamos un aumento significativo tras 6 meses de tratamiento en las células naïve y una disminución significativa de las células de memoria efectora y terminalmente diferenciadas tanto en el grupo total de pacientes como en los pacientes respondedores y no respondedores al fármaco, con la excepción de los CD8+ naïve donde el aumento sólo se ve en el grupo total, probablemente por la pérdida de potencia estadística que deriva de separar a los pacientes en respondedores y no respondedores. Sin embargo, el fármaco indujo una disminución selectiva de las células CD4+ y CD8+ de memoria central en los respondedores óptimos. La disminución de linfocitos de memoria central y efectora se ha corroborado en los distintos estudios que se han hecho sobre el mecanismo de acción de dimetilfumarato antes y después de nuestro estudio (248,256,257). Sin embargo, el papel de la disminución de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de memoria central para predecir una respuesta óptima al tratamiento no se ha explorado en otros trabajos. Estas subpoblaciones, más allá de los linfocitos T CD8+ totales, podrían ser biomarcadores útiles en la práctica clínica, dada la relativa facilidad de su estudio. En cuanto al papel de esta subpoblación en la EM, existen datos sobre la existencia de niveles elevados de linfocitos CD8+ de memoria central en la enfermedad que sugieren que estas células pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la misma (258). Además, estudios de respuesta a otros fármacos, entre ellos fingolimod, han asociado la depleción de linfocitos T de memoria central en sangre periférica con la mejoría clínica derivada de su uso (259).

En cuanto al compartimento B, no observamos variaciones en el porcentaje total de linfocitos B ni en el de plasmablastos en respuesta a dimetilfumarato, pero sí en la subpoblación de

memoria, que disminuía de nuevo específicamente en el grupo de respondedores óptimos. La bajada de linfocitos B y particularmente de los de memoria, también se ha objetivado en distintos trabajos sobre los cambios inducidos por dimetilfumarato en la EM (253,260,261). Estudios posteriores han encontrado que esta disminución se da tanto si existe o no cambio de isotipo (261–263). También se ha descrito un aumento de linfocitos B naïve (260–262). Existen diversos datos que apoyan la implicación de los linfocitos B de memoria en la patología, como son su aumento en las formas pediátricas y adultas (107,264), su asociación con el proceso neurodegenerativo (265) y su detección en lesiones *postmortem* (266). Además, se ha descrito que durante un brote se produce una disminución en periferia y una consecuente acumulación en el SNC (264). Por otro lado, la asociación entre la disminución de linfocitos B de memoria y la respuesta al tratamiento se ha descrito previamente con otros fármacos inmunomoduladores (267–269), lo que apoya que es una buena diana. Además estudios con otros fármacos modificadores de otras enfermedades de base autoinmune también han relacionado la bajada de células B de memoria con los buenos respondedores (270). Estos datos apoyan nuestros resultados sobre el posible uso del descenso de esta población para identificar respondedores óptimos a dimetilfumarato. Además, indican que este fármaco podría tener un papel importante sobre la respuesta B alterada en la EM, sin los posibles efectos secundarios derivados de eliminar a todos los linfocitos B.

En nuestro estudio, las subpoblaciones B y T reguladoras identificadas con marcadores de superficie no se vieron modificadas por el fármaco en ninguno de los grupos. En este aspecto hay controversia ya que los estudios en los que utilizan los marcadores generales para valorar las poblaciones reguladoras de células T no encuentran variaciones inducidas por el fármaco (257). Sin embargo, al estudiar diferentes subtipos de fenotipo regulador como las células Helios- FoxP3+, si se ha observado un aumento de las mismas tras el tratamiento (252). Además, se ha observado mediante estudios de apoptosis *in vitro* que el fármaco tenía una mayor afinidad sobre las células efectoras que sobre las reguladoras (256). En cuanto a las B

reguladoras, estudios *in vitro* han evidenciado un aumento de las mismas en cultivos celulares a los que se añade dimetilfumarato (271) pero esto no se confirma al mirar el efecto del fármaco en pacientes con EM (261,262).

Al investigar los cambios en la producción de citocinas intracelulares por parte de linfocitos T y B, observamos una disminución clara de la producción de IFN-gamma por los linfocitos T CD4+ y CD8+, así como de la producción de TNF-alfa por los linfocitos T CD8+. Estas variaciones post-tratamiento que se observan en el grupo total se debían de nuevo a los resultados del grupo NEDA, no evidenciándose cambios en los pacientes ODA. Además, exclusivamente en el grupo de respondedores óptimos, observamos una disminución de la producción de TNF-alfa intracelular por parte de los linfocitos B. La disminución de la secreción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T y B en pacientes tratados con dimetilfumarato se ha confirmado en distintos trabajos realizados sobre el mecanismo de acción de este fármaco, si bien hay algunas diferencias sobre las poblaciones productoras que disminuyen entre los distintos estudios probablemente debidas a la diferencia en los protocolos de estimulación de cada grupo, al número de pacientes estudiados y a los distintos resultados que se objetivan entre pacientes respondedores y no respondedores (252,256,257,261,262). Esto es importante ya que los linfocitos productores de citocinas juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la inflamación en la EM (272,273) y nuestros datos indican que su disminución es clave para obtener una respuesta completa al tratamiento en estos pacientes. Dentro de los linfocitos B, se ha descrito que las células de memoria son la principal subpoblación productora de citocinas proinflamatorias como TNF-alfa y linfotoxina (109). Por tanto, la disminución de las células B de memoria en nuestra cohorte está en concordancia con la disminución de las células B productoras de TNF-alfa. Esto se ha observado en respuesta a otros tratamientos en la EM como la mitoxantrona donde hay una disminución de los linfocitos B de memoria *in vivo* y de la producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* (109).

Los cambios en el perfil proinflamatorio producidos por dimetilfumarato son similares a los de fármacos inductores como el alemtuzumab (274).

Dentro de las células NK, confirmamos que no había variaciones en su porcentaje total durante el tratamiento con dimetilfumarato. Sin embargo, encontramos una disminución significativa en el porcentaje de NKT y un aumento de CD56 bright. Las células CD56 bright se caracterizan por el predominio de la función secretora frente a la citolítica, siendo capaces de producir tanto citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias según el contexto (275,276). En EM se ha propuesto que desempeñan un papel regulador, y se ha descrito que un aumento en estas células NK se asocia con una buena respuesta a diferentes tratamientos como daclizumab, IFN-beta, alemtuzumab o fingolimod (116,208,277,278). Estos datos en las subpoblaciones NK reguladoras han sido confirmados en un estudio publicado en el mismo año (279). En nuestra cohorte, no sólo observamos un aumento de las células CD56 bright, sino también una correlación negativa de éstas con varias células productoras de citocinas proinflamatorias. Esta regulación al alza podría ser la responsable de la inhibición de las subpoblaciones efectoras relevantes en la patogénesis durante el tratamiento y podría otorgar a las células NK CD56 bright la posibilidad de suplir las funciones deficitarias de los linfocitos T reguladores en la EM (98).

Recientemente se ha publicado un estudio muy amplio con datos de subpoblaciones de los pacientes incluidos en el ensayo clínico prospectivo PROCLAIM (280). En un total de 163 pacientes han observado una disminución de las subpoblaciones de memoria central y de memoria efectora de los linfocitos TCD4+ y CD8+ y un aumento de los linfocitos naïve a los 6 meses. La proporción de células reguladoras se mantuvo estable en los primeros 6 meses de tratamiento en este estudio. También observaron un aumento de los linfocitos B naïve y de las células NK bright, así como una disminución de los linfocitos B con y sin cambio de isotipo. Los datos sobre producción de citocinas no fueron concluyentes, posiblemente por estar asociados a la respuesta al fármaco y observarse principalmente en pacientes en NEDA. De esta forma se

hace evidente que el estudio conjunto de marcadores inmunológicos y respuesta clínica es importante para dilucidar el mecanismo de acción de los fármacos inmunomoduladores en la EM.

En resumen, nuestros datos muestran que dimetilfumarato es muy efectivo induciendo un cambio en la relación entre subpoblaciones reguladoras y efectoras circulantes, favoreciendo una respuesta reguladora que se asocia con una mejora del curso del paciente. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, una discriminación fina y temprana entre respondedores óptimos o subóptimos a este tratamiento es crucial. Nuestros datos sugieren que la regulación a la baja de linfocitos T de memoria central y B de memoria, así como el aumento de células NK CD56 bright podrían ser buenos candidatos para la identificación temprana de respondedores óptimos a dimetilfumarato, por los resultados altamente significativos del estudio, así como por la relativa facilidad técnica del mismo. En la tabla 1 se resumen los principales hallazgos encontrados en nuestro trabajo en comparación con otros estudios.

Tabla 1. Estudios sobre el efecto de dimetilfumarato sobre las subpoblaciones linfoides

ESTUDIO	DISEÑO	EFECTOS		
		SUBPOBLACIONES LT	SUBPOBLACIONES LB	OTROS
Gross y cols. (2015)	15 P Inicio/6M	↓ MC, ME ↓ IFN- γ^2 , GM-CSF ² , TNF- α^2 ↑ Treg (Helios-)		
Lundy y cols. (2016)	13 P Inicio/4-6M/>12M		↓ totales, memoria ↑ CD24 ^{high} CD38 ^{high}	
Longbrake y cols. (2015)	17 P sin tratamiento 41 P tratados >6M	↑ naïve ↓ MC, ME		↓ NK CD56 ^{dim}
Ghadiri y cols. (2017)	13 P Inicio/6M	↑ naïve ↓ MC, ME, IFN- γ^1		
Li y cols. (2017)	13 P Inicio/3M		↓ totales, memoria ↓ GM-CSF, TNF- α , IL-6	
Smith y cols. (2017 y 2018)	18 P Inicio/6M		↑ naïve ↓ memoria ↓ GM-CSF, TNF- α , IL-6	↑ NK CD56 ^{bright}
Wu y cols. (2017)	18 P sin tratamiento 20 P tratados 4-6M 18 P tratados 18-26M	↓ totales ↑ naïve ↓ MC, ME, IFN- γ^1 , IL-17 ¹		
Longbrake y cols. (2018)	50 P sin tratamiento 66 P tratados	↓ IFN- γ^1 , TNF- α^1 , GM-CSF ²	↓ memoria ↑ naïve	
Hoglund y cols. (2018)	10 P tratados con DMF 18 P sin/otros tratamientos		↓ memoria ↓ HLA-DR	
Medina y cols. (2017)	64 P Inicio/6M NEDA/ODA	↓ T CD8+ ↑ naïve ↓ ME ↓ CD8+ TD NEDA: ↓ MC, IFN- γ^1 , TNF- α^3	↓ memoria NEDA: ↓ memoria NEDA: ↓ TNF- α	↓ NKT, ↑ NK CD56 ^{bright} NEDA: ↑ NK CD56 ^{bright}

DMF, dimetilfumarato; M, meses; MC, memoria central; ME memoria efectora; NEDA, no evident disease activity; ODA, ongoing disease activity; P, pacientes; TD, terminalmente diferenciados. Producción de citocinas por linfocitos T CD4+ y CD8+(1), por CD4+ (2) y por CD8+ (3).

5.2. Estudio con teriflunomida en pacientes con EMRR

Teriflunomida, metabolito de la molécula leflunomida, es un inhibidor de la enzima DHODH que frena el curso de la EM reduciendo la proliferación de linfocitos (180). Esta molécula impide la síntesis *de novo* de pirimidinas necesaria para mantener un estado proliferativo elevado. Aparte de la inhibición de la proliferación linfocitaria (182), estudios realizados *in vitro* con la molécula leflunomida han descrito su efecto sobre la vía del NF- κ B (281), sobre el ciclo celular (181) y la formación de la sinapsis inmunológica (184,282). Por otro lado, en el modelo animal de la enfermedad se ha visto su capacidad de modular la función efectora de linfocitos independientemente de la inhibición enzimática (186), así como un aumento de las células reguladoras (283,284).

Del mismo modo que con leflunomida, la mayoría de los estudios disponibles con la molécula teriflunomida se han realizado *in vitro* o utilizando modelos animales de la enfermedad. Se ha descrito una disminución de la infiltración de linfocitos T, linfocitos B y monocitos en la médula de ratones enfermos (285), así como una disminución de la desmielinización (286). Además en un estudio realizado sobre tejido linfoide asociado a intestino en ratones se vio que disminuían las células presentadoras de antígeno y aumentaban las células T reguladoras CD39+, y que además estas últimas tenían un efecto protector de EAE sobre ratones (287). *In vitro* se ha descrito que teriflunomida disminuye la proliferación de linfocitos T, así como la liberación de citocinas en los monocitos en células de individuos sanos (185). Recientemente, se ha demostrado otro mecanismo de acción para este fármaco que consiste en la inhibición de la fosforilación oxidativa y la glicolisis, reduciéndose aún más la proliferación de clones de linfocitos T activos en la EM (288).

Sobre el efecto en poblaciones linfoides circulantes se dispone de menos datos. Usando como objeto de estudio una pequeña cohorte de pacientes se vio una disminución del número total de células B reguladoras y de memoria a los 12 meses de tratamiento (289). El objeto de nuestro

estudio fue ampliar el conocimiento existente sobre el mecanismo de acción inmunológico de este fármaco. Recogimos muestras de sangre periférica de 55 pacientes tratados con teriflunomida durante al menos 6 meses. Además, conseguimos datos clínicos y radiológicos de evolución a un año en 32 de estos pacientes e investigamos las diferencias existentes entre respondedores óptimos y subóptimos durante el tratamiento, utilizando el NEDA 3 como criterio de respuesta al igual que en el estudio de dimetilfumarato (Anexo A).

Exploramos el efecto del fármaco, comparando las muestras a inicio y 6 meses de tratamiento. Primero estudiamos los cambios inducidos en el número de linfocitos totales. Nuestros datos fueron similares a los de los ensayos clínicos TEMSO, TOWER y TENERE que incluían un total de 1895 pacientes (290). Al analizar el grupo completo observaron una disminución del número total de linfocitos hasta la semana 24, momento en el cual el recuento se estabilizó. En ese momento la linfopenia grado 1 y 2 era extremadamente infrecuente y no se detectaron pacientes con grado 3 ó 4 (290). En nuestra cohorte, los pacientes mostraron una discreta disminución del número total de linfocitos tras seis meses de tratamiento, si bien ninguno desarrolló linfopenia inducida por el fármaco durante el seguimiento.

Dentro del grupo de subpoblaciones efectoras y de memoria, observamos que el tratamiento con teriflunomida inducía una disminución en el porcentaje y número de linfocitos T CD4+ terminalmente diferenciados y de plasmablastos en el grupo total de pacientes de nuestra cohorte. Estas variaciones se mantenían al clasificar a los pacientes en respondedores óptimos y subóptimos, aunque la disminución de linfocitos CD4+ terminalmente diferenciados era más patente en el primer grupo. Además, observamos una disminución de los linfocitos T totales y CD8+ terminalmente diferenciados exclusivamente en el grupo NEDA. Los linfocitos T terminalmente diferenciados son células que tiene como destino los tejidos donde van a desarrollar sus funciones efectoras, entre las que destaca la secreción de citocinas (291). Su disminución podría ser un punto importante en la mejoría de los pacientes ya que son las células

que van a migrar a los tejidos inflamados. Los plasmablastos, por su parte, son un subtipo de células B secretoras de anticuerpos altamente diferenciadas que se encuentran elevados en sangre periférica de pacientes con EM desde las primeras fases de la enfermedad, cuya cantidad además correlaciona con la gravedad de la misma (292). La disminución en ambas poblaciones efectoras puede contribuir al beneficio que este fármaco aporta a los pacientes y está en consonancia con la disminución de la infiltración T y B del SNC en estudios con el modelo animal de EAE (285). Además la disminución del marcador de activación CD69, cuya expresión aumenta tras la activación linfocitaria (293), pone de manifiesto el efecto de teriflunomida sobre la activación T. Nuestros datos confirman *in vivo* y sin estimulación, los hallazgos que Li y cols. obtuvieron *in vitro*, estimulando CMSP de individuos sanos tratados con el fármaco (185).

No encontramos cambios en la producción intracelular de citocinas proinflamatorias. Como hemos visto, el mayor efecto de este fármaco se produce en la subpoblación de linfocitos terminalmente diferenciados que, aunque su principal función es la secreción de citocinas, representan un bajo porcentaje del total de los linfocitos T CD4+ (entorno a un 10%). Esta baja proporción podría ser la responsable de que no podamos apreciar las variaciones en dichas citocinas por citometría de flujo.

Cuando estudiamos las poblaciones inmunomoduladoras, observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos CD8+ y monocitos productores de IL-10 después de 6 meses de tratamiento en el grupo completo. Nuestros resultados se corresponden con los encontrados *in vitro* con leflunomida en los que se observa un aumento de la producción de IL-10 por parte de linfocitos T (186). Además, encontramos una correlación positiva entre los valores de linfocitos T CD8+ IL-10+ y los linfocitos CD19+ IL-10+, lo que sugiere que este fármaco podría inducir una respuesta tolerogénica. Esta regulación al alza de las células con perfil inmunomodulador es importante en el contexto de esta enfermedad, en la que se ha descrito que este tipo de respuesta está alterada (98). En el modelo animal de artritis y en la EAE se ha visto un aumento

de linfocitos T reguladores en bazo (284) y en mucosa intestinal (287) tras el tratamiento con leflunomida. En ratones con dermatitis alérgica de contacto, enfermedad en la que se produce una activación T y secreción de citocinas, se ha visto que leflunomida induce una mejoría de la misma a través de la inducción de una respuesta tolerogénica en la que los principales protagonistas son los linfocitos T CD8+, en los que se ha visto un aumento de los niveles de ARN mensajero de IL-10 (283).

Siguiendo con las poblaciones inmunomoduladoras, observamos un aumento de monocitos PD-L1+ inducido por el fármaco. Además, cuando clasificamos a los pacientes en función de su actividad clínica, observamos que sólo en el grupo de respondedores óptimos se mantiene este aumento. PD-L1 es el ligando de PD-1, un receptor de superficie que tiene un papel importante en la regulación a la baja del sistema inmune, induciendo la autotolerancia y suprimiendo la actividad inflamatoria T (294). La interacción PD-1 y PD-L1 induce la inhibición de la proliferación, producción de citocinas y actividad citolítica (295). La deficiencia de PD-1 en animales desarrolla diversas enfermedades autoinmunes (296,297) y su bloqueo aumenta la gravedad de la EAE (298,299). PD-1/PD-L1 representa un punto de control de la respuesta inmune y su regulación alta en monocitos puede ser importante para la modulación de la respuesta anormal del sistema inmune durante la enfermedad. En nuestra serie, la sobreexpresión de PD-L1 podría contribuir a la disminución de terminalmente diferenciados ya que al incubar CMSP de pacientes con un anticuerpo neutralizante anti-PD-L1, observamos un aumento de la proliferación de estas células. Aunque en los estudios de proliferación de Li y cols. observan que teriflunomida actúa sobre este proceso de forma dependiente de la inhibición de DHODH ya que se restaura la actividad tras la adición de uridina, nuestro estudio vislumbra otra posibilidad de inhibición de la proliferación independiente de esta enzima (185).

También se ha descrito la importancia de la molécula PD-L1 en otras poblaciones diferentes a los monocitos y en otras enfermedades autoinmunes (300). La proporción de células B CD19+

PD-L1+ es inferior en pacientes de artritis reumatoide no tratados que en controles sanos, y además se ven incrementadas en los respondedores óptimos (300). Parece que la capacidad supresora de esta molécula está disminuida en esta enfermedad y su aumento provoca una mejoría clínica. En este estudio también encuentran una relación entre el bloqueo de PD-L1 y el aumento de la proliferación de linfocitos T CD8+ y CD4+ *in vitro* con células de controles sanos.

Por último, observamos un aumento de las células NK CD56 bright en el grupo de respondedores óptimos a los 6 meses del tratamiento. Como se comentó anteriormente, estas células desempeñan una función inmunomoduladora y, junto con el aumento de monocitos PD-L1, podrían suplir la función reguladora deficiente que existe en la enfermedad. Además, ambos biomarcadores podrían ser indicadores de la respuesta óptima al tratamiento.

Por tanto, teriflunomida induce un cambio en la respuesta inmune anómala que tiene lugar en la EM. Nuestro estudio ha contribuido a dilucidar el efecto del fármaco sobre el sistema inmunitario. Según nuestros datos, una de las dianas más claras de teriflunomida serían los linfocitos terminalmente diferenciados y células reguladoras de la respuesta inmune innata. Así mismo, hemos encontrado biomarcadores potenciales de respuesta al tratamiento, siendo el aumento de células NK CD56 bright el más prometedor. En la tabla 2 se resumen los principales hallazgos encontrados en nuestro trabajo en relación con los de Gandoglia y cols.

Tabla 2. Estudios sobre el efecto de teriflunomida sobre las subpoblaciones linfoides.

ESTUDIO	DISEÑO	EFECTOS		
		SUBPOBLACIONES LT	SUBPOBLACIONES LB	OTROS
Gandoglia y cols. (2017)	10 P Inicio/12M	↓ efectoras ¹	↓ totales ↓ memoria ¹ ↓ maduras ↓ reguladoras	
Medina y cols. (2019)	55 P Inicio/6M NEDA/ODA	↓ CD4+ TD ↓ CD4+ CD69+ ↑ CD8+ IL-10+ NEDA: ↓ CD8+ TD	↓ plasmablastos NEDA: ↓ memoria NEDA: ↓ TNF-α	↑ NK CD56 ^{bright} ↑ CD14+ IL-10+ ↑ CD14+ PD-L1+ NEDA: ↑ NK CD56 ^{bright}

M, meses; NEDA, no evident disease activity; ODA, ongoing disease activity; P, pacientes TD, terminalmente diferenciados. Se observa una tendencia, pero los cambios no son estadísticamente significativos (1).

Aunando los datos obtenidos en los estudios con dimetilfumarato y teriflunomida, ambos fármacos provocan una disminución de diferentes células efectoras y el aumento de otras reguladoras, lo cual encaja con los conocimientos de que se dispone sobre la EM, en la que hay un desbalance entre respuestas efectoras y reguladoras. Por tanto, un aumento de las respuestas reguladoras podría estar contribuyendo a la mejoría del curso de la enfermedad.

Los estudios de respuesta al tratamiento como el nuestro también arrojan información sobre los mecanismos que subyacen a la patología. En este sentido la citometría de flujo ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad. La utilización de protocolos de marcaje y de establecimiento de parámetros técnicos de los equipos permite una alta reproducibilidad en sus resultados (219,301). Además, la implementación en un futuro cercano de sistemas automatizados que permitan una medición “clónica” de subpoblaciones en distintos instrumentos se presentan como herramientas muy prometedoras para predecir la respuesta a tratamiento en la EM.

Conclusiones

1. El tratamiento con dimetilfumarato induce un aumento de los linfocitos T naïve y de células NK CD56 bright, así como una disminución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria efectora, de los linfocitos T CD8+ terminalmente diferenciados y de los linfocitos B de memoria, en el grupo total de pacientes.
2. La comparación entre respondedores óptimos y subóptimos mostró que el aumento de las células NK CD56 bright y de los linfocitos B de memoria se restringe al grupo de respondedores óptimos, que además mostró una disminución de células T CD4+ y CD8+ de memoria central que no se vio en el grupo total de pacientes.
3. El tratamiento con dimetilfumarato también produce una disminución de linfocitos T CD4+ productores de IFN-gamma y de linfocitos T CD8+ productores de IFN-gamma, TNF-alfa y GM-CSF en el grupo total de pacientes.
4. La disminución de la producción de citocinas proinflamatorias por linfocitos T se restringe al grupo de respondedores óptimos al tratamiento con dimetilfumarato. Estos pacientes también mostraron una reducción de células B productoras de TNF-alfa que no se observó en el grupo total de pacientes.
5. La bajada de la proporción de linfocitos T CD8+ productores de citocinas proinflamatorias correlaciona inversamente con el aumento de células NK CD56 bright en los pacientes tratados con dimetilfumarato.
6. El tratamiento con teriflunomida indujo una disminución de linfocitos T CD4+ terminalmente diferenciados y de plasmablastos, así como un aumento de linfocitos T CD8+ y monocitos productores de IL-10 y de monocitos que expresan PD-L1+. También inhibió la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4+.
7. No hubo diferencias significativas en las variables mencionadas anteriormente entre respondedores óptimos y subóptimos al tratamiento con teriflunomida.

8. El aumento de monocitos PD-L1+ se correlacionó inversamente con la bajada de las subpoblaciones de linfocitos T de memoria y efectoras a los 6 meses de tratamiento con teriflunomida. Además, el bloqueo de PD-L1 estimuló la proliferación de linfocitos T terminalmente diferenciados *in vitro*.
9. Los pacientes que mostraron una respuesta óptima a teriflunomida se caracterizaron por una reducción significativa de linfocitos T CD8+ terminalmente diferenciados y un aumento de células NK CD56 bright a los seis meses de tratamiento.
10. La respuesta a dimetilfumarato y teriflunomida se asoció con una reprogramación de la respuesta inmunitaria, con aumento de células reguladoras y una disminución de células efectoras. Este cambio se detecta de una forma más completa en los respondedores óptimos.
11. La monitorización de las subpoblaciones asociadas con la respuesta óptima podría utilizarse como biomarcador temprano de respuesta óptima.

Bibliografía

1. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain. Paris: JB Bailliere. 1829;
2. Carswell R, Polman CH. Pathological anatomy: Illustrations of the elementary forms of disease. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman. 1838;
3. Charcot JM. Histologie de la sclèrose en plaques. Gaz Hôp (Paris). 1868;554-66.
4. Pierre M. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. La Progres Medicale. 1884;12:287-9.
5. Rivers TM, Schwentker FF. ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS. J Exp Med. 1935;61(5):689-702.
6. Quincke H. Die Lumbar punktion des Hydrocephalus. Klin Wochenschr. 1891;20:929-33.
7. Kabat EA, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. J Clin Invest. 1943;21:571-7.
8. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke J, McDowell F. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. 1965;122(Ann NY Acad Sci):552-68.
9. Poser CM. Taxonomy and diagnostic parameters in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 1984;436:233-46.
10. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2018;17(2):162-73.
11. Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. Neurology. 1955;5(8):580-3.
12. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33(11):1444-52.
13. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. Acta Neurol Scand. 1975;51(2):110-36.
14. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand. 1975;51(2):137-57.
15. Fernández O, Fernández V, Guerrero M, León A, López-Madróna JC, Alonso A, et al. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. Mult Scler. 2012;18(3):372-6.
16. Otero-Romero S, Ramió-Torrentà L, Pericot I, Carmona O, Perkal H, Saiz A, et al. Onset-adjusted incidence of multiple sclerosis in the Girona province (Spain): Evidence of increasing risk in the south of Europe. J Neurol Sci. 2015;359(1-2):146-50.

17. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-4.
18. Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 2006;5(11):932-6.
19. Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC, et al. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult Scler*. 2013;19(10):1261-7.
20. Bermel RA, Rae-Grant AD, Fox RJ. Diagnosing multiple sclerosis at a later age: more than just progressive myelopathy. *Mult Scler*. 2010;16(11):1335-40.
21. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(1):25-36.
22. Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(22):12877-82.
23. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler*. 2005;11(5):504-10.
24. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*. 1972;1(7762):1240-1.
25. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2015;47(10):1107-13.
26. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007;357(9):851-62.
27. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012;488(7412):508-11.
28. Taşan M, Musso G, Hao T, Vidal M, MacRae CA, Roth FP. Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally coherent subnetworks. *Nat Methods*. 2015;12(2):154-9.
29. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(10):1132-41.
30. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520-32.

31. Westerlind H, Boström I, Stawiarz L, Landtblom A-M, Almqvist C, Hillert J. New data identify an increasing sex ratio of multiple sclerosis in Sweden. *Mult Scler*. 2014;20(12):1578-83.
32. Berg-Hansen P, Moen SM, Sandvik L, Harbo HF, Bakken IJ, Stoltenberg C, et al. Prevalence of multiple sclerosis among immigrants in Norway. *Mult Scler*. 2015;21(6):695-702.
33. Ahlgren C, Odén A, Lycke J. A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden. *Mult Scler*. 2012;18(8):1099-107.
34. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009;215(1-2):102-7.
35. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS ONE*. 2010;5(9).
36. Salvetti M, Giovannoni G, Aloisi F. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2009;22(3):201-6.
37. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 2007;204(12):2899-912.
38. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995;80(5):695-705.
39. Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*. 2015;5(5):413-24.
40. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, et al. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2014;570:108-13.
41. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006;296(23):2832-8.
42. Sandberg L, Biström M, Salzer J, Vågberg M, Svenningsson A, Sundström P. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(8):1027-31.
43. Fitzgerald KC, Munger KL, Köchert K, Arnason BGW, Comi G, Cook S, et al. Association of Vitamin D Levels With Multiple Sclerosis Activity and Progression in Patients Receiving Interferon Beta-1b. *JAMA Neurol*. 2015;72(12):1458-65.
44. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler*. 2007;13(5):610-5.
45. Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(11):867-74.

46. Ramanujam R, Hedström A-K, Manouchehrinia A, Alfredsson L, Olsson T, Bottai M, et al. Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA Neurol.* 2015;72(10):1117-23.
47. Hedström AK, Alfredsson L, Lundkvist Ryner M, Fogdell-Hahn A, Hillert J, Olsson T. Smokers run increased risk of developing anti-natalizumab antibodies. *Mult Scler.* 2014;20(8):1081-5.
48. Hedström AK, Ryner M, Fink K, Fogdell-Hahn A, Alfredsson L, Olsson T, et al. Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon β -1a. *Mult Scler.* 2014;20(4):445-50.
49. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2011;17(7):788-93.
50. Barragán-Martínez C, Speck-Hernández CA, Montoya-Ortiz G, Mantilla RD, Anaya J-M, Rojas-Villarraga A. Organic solvents as risk factor for autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e51506.
51. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73(9):696-701.
52. Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Koebnick C. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology.* 2013;80(6):548-52.
53. Munger KL. Childhood obesity is a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(13):1800.
54. Hedström AK, Åkerstedt T, Olsson T, Alfredsson L. Shift work influences multiple sclerosis risk. *Mult Scler.* 2015;21(9):1195-9.
55. Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(1):26-31.
56. Correale J, Farez MF. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. *Mult Scler.* 2011;17(10):1162-9.
57. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011;479(7374):538-41.
58. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(40):10713-8.
59. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009;139(3):485-98.
60. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* 2010;3(5):487-95.

61. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(40):10719-24.
62. Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2016;7:12015.
63. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
64. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
65. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 2014;72 Suppl 1:1-5.
66. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology*. 1980;30(3):240-4.
67. Reiber H. [Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1979;17(9):587-91.
68. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977;37(5):397-401.
69. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(8):897-902.
70. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stüve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(5):267-76.
71. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol*. 2005;62(4):574-7.
72. Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, et al. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology*. 2006;66(4):576-8.
73. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
74. Traugott U. Characterization and distribution of lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis plaques versus autoimmune demyelinating lesions. *Springer Semin Immunopathol*. 1985;8(1-2):71-95.
75. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1986;19(6):578-87.

76. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007;13(10):1173-5.
77. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;66(3):390-402.
78. Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Viseruna A, et al. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2013;123(1):247-60.
79. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain.* 2018;141(5):1334-49.
80. Volpe E, Battistini L, Borsellino G. Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:475158.
81. Moore CS, Rao VTS, Durafourth BA, Bedell BJ, Ludwin SK, Bar-Or A, et al. miR-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. *Ann Neurol.* 2013;74(5):709-20.
82. Ronchi F, Basso C, Preite S, Reboldi A, Baumjohann D, Perlini L, et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. *Nat Commun.* 2016;7:11541.
83. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain.* 2005;128(Pt 8):1747-63.
84. Denic A, Wootla B, Rodriguez M. CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(9):1053-66.
85. Melzer N, Meuth SG, Wiendl H. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB J.* 2009;23(11):3659-73.
86. Malmeström C, Lycke J, Haghighi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J Neuroimmunol.* 2008;196(1-2):159-65.
87. Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, et al. CD161(high)CD8+ T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(Pt 2):542-54.
88. Huseby ES, Huseby PG, Shah S, Smith R, Stadinski BD. Pathogenic CD8 T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol.* 2012;3:64.
89. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. *J Immunol.* 2015;194(11):5085-93.

90. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169(9):4712-6.
91. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16(2):249-56.
92. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005;175(5):3025-32.
93. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;191(1-2):70-8.
94. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45(11):1353-60.
95. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens J-L, et al. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 2008;123(1):79-89.
96. Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006;116(12):3252-7.
97. Fritzsche B, Haas J, König F, Kunz P, Fritzsche E, Pöschl J, et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS ONE.* 2011;6(3):e17988.
98. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971-9.
99. Lu W, Chen S, Lai C, Lai M, Fang H, Dao H, et al. Suppression of HIV Replication by CD8(+) Regulatory T-Cells in Elite Controllers. *Front Immunol.* 2016;7:134.
100. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Plantone D, Patanella AK, Tonali PA, et al. CD8(+)Foxp3(+) T cells in peripheral blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Hum Immunol.* 2010;71(5):437-41.
101. Aristimuño C, Navarro J, de Andrés C, Martínez-Ginés L, Giménez-Roldán S, Fernández-Cruz E, et al. Expansion of regulatory CD8+ T-lymphocytes and fall of activated CD8+ T-lymphocytes after i.v. methyl-prednisolone for multiple sclerosis relapse. *J Neuroimmunol.* 2008;204(1-2):131-5.
102. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(5):625-38.

103. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130(Pt 4):1089-104.
104. Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons J-A. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):63-70.
105. Monson NL, Cravens PD, Frohman EM, Hawker K, Racke MK. Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B cells in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2005;62(2):258-64.
106. Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014;76(2):231-40.
107. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 2010;67(4):452-61.
108. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*. 2015;7(310):310ra166.
109. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007;178(10):6092-9.
110. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med*. 2012;209(5):1001-10.
111. Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, et al. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6:626.
112. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2001;124(Pt 11):2169-76.
113. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, Cantaert T, Lynch M, Preston-Hurlburt P, et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2013;123(6):2737-41.
114. Schleinitz N, Vély F, Harlé J-R, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010;131(4):451-8.
115. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, et al. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2016;72:8-18.
116. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-

- 2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(15):5941-6.
117. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci*. 2007;28(3):121-6.
 118. Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, et al. Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology*. 1996;195(4-5):588-600.
 119. Labzin LI, Heneka MT, Latz E. Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu Rev Med*. 2018;69:437-49.
 120. Jiang Z, Jiang JX, Zhang G-X. Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett*. 2014;160(1):17-22.
 121. Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2013;16(9):1211-8.
 122. IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology*. 2001;57(12 Suppl 5):S3-9.
 123. Mitsdoerffer M, Kuchroo V. New pieces in the puzzle: how does interferon-beta really work in multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2009;65(5):487-8.
 124. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;56(6):702-8.
 125. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. 1995. *Neurology*. 2001;57(12 Suppl 5):S16-24.
 126. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 2002;296(5566):346-9.
 127. Groves A, Kihara Y, Chun J. Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci*. 2013;328(1-2):9-18.
 128. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):387-401.
 129. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402-15.
 130. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;69(5):759-77.

131. Cohen JA, Arnold DL, Comi G, Bar-Or A, Gujrathi S, Hartung JP, et al. Safety and efficacy of the selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator ozanimod in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(4):373-81.
132. Kappos L, Li DKB, Stüve O, Hartung H-P, Freedman MS, Hemmer B, et al. Safety and Efficacy of Siponimod (BAF312) in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Dose-Blinded, Randomized Extension of the Phase 2 BOLD Study. *JAMA Neurol*. 2016;73(9):1089-98.
133. Leist TP, Weissert R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. 2011;34(1):28-35.
134. Giovannoni G. Cladribine to Treat Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017;14(4):874-87.
135. Baker D, Pryce G, Herrod SS, Schmierer K. Potential mechanisms of action related to the efficacy and safety of cladribine. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;30:176-86.
136. Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, Vollmer T. The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2005;19(11):909-22.
137. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):899-910.
138. Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, et al. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2006;354(9):924-33.
139. McGuigan C, Craner M, Guadagno J, Kapoor R, Mazibrada G, Molyneux P, et al. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(2):117-25.
140. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, et al. Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol*. 2013;191(12):5867-74.
141. Zhang J, Shi S, Zhang Y, Luo J, Xiao Y, Meng L, et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11:CD010968.
142. Costelloe L, Jones J, Coles A. Secondary autoimmune diseases following alemtuzumab therapy for multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2012;12(3):335-41.
143. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord*. 2016;9(1):44-52.

144. Etemadifar M, Salari M, Mirmosayyeb O, Serati M, Nikkhah R, Askari M, et al. Efficacy and safety of rituximab in neuromyelitis optica: Review of evidence. *J Res Med Sci*. 2017;22:18.
145. Sorensen PS, Lisby S, Grove R, Derosier F, Shackelford S, Havrdova E, et al. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology*. 2014;82(7):573-81.
146. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):209-20.
147. Nash RA, Hutton GJ, Racke MK, Popat U, Devine SM, Steinmiller KC, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS. *Neurology*. 2017;88(9):842-52.
148. Scolding NJ, Pasquini M, Reingold SC, Cohen JA, International Conference on Cell-Based Therapies for Multiple Sclerosis, International Conference on Cell-Based Therapies for Multiple Sclerosis, et al. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(11):2776-96.
149. Raftopoulos R, Hickman SJ, Toosy A, Sharrack B, Mallik S, Paling D, et al. Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):259-69.
150. Green AJ, Gelfand JM, Cree BA, Bevan C, Boscardin WJ, Mei F, et al. Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet*. 2017;390(10111):2481-9.
151. Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, Chan D, MacManus D, Hunter K, et al. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2014;383(9936):2213-21.
152. Tran JQ, Rana J, Barkhof F, Melamed I, Gevorkyan H, Wattjes MP, et al. Randomized phase I trials of the safety/tolerability of anti-LINGO-1 monoclonal antibody BIIB033. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(2):e18.
153. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-107.
154. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1087-97.
155. Gold R, Arnold DL, Bar-Or A, Hutchinson M, Kappos L, Havrdova E, et al. Long-term effects of delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis: Interim analysis of ENDORSE, a randomized extension study. *Mult Scler*. 2017;23(2):253-65.
156. Baharnoori M, Lyons J, Dastagir A, Koralnik I, Stankiewicz JM. Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(5):e274.

157. Rosenkranz T, Novas M, Terborg C. PML in a patient with lymphocytopenia treated with dimethyl fumarate. *N Engl J Med*. 2015;372(15):1476-8.
158. Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, Hemmer B, Warnke C, Menge T, et al. Dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Rev Neurother*. 2015;15(4):339-46.
159. Linker RA, Lee D-H, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(Pt 3):678-92.
160. Scannevin RH, Chollate S, Jung M, Shackett M, Patel H, Bista P, et al. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341(1):274-84.
161. Kihara Y, Groves A, Rivera RR, Chun J. Dimethyl fumarate inhibits integrin $\alpha 4$ expression in multiple sclerosis models. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(10):978-83.
162. Schulze-Topphoff U, Varrin-Doyer M, Pekarek K, Spencer CM, Shetty A, Sagan SA, et al. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(17):4777-82.
163. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol*. 2015;283:74-85.
164. Blewett MM, Xie J, Zaro BW, Backus KM, Altman A, Teijaro JR, et al. Chemical proteomic map of dimethyl fumarate-sensitive cysteines in primary human T cells. *Sci Signal*. 2016;9(445):rs10.
165. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, Grimm M, Karsten CM, et al. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2188-92.
166. Parodi B, Rossi S, Morando S, Cordano C, Bragoni A, Motta C, et al. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathol*. 2015;130(2):279-95.
167. Dibbert S, Clement B, Skak-Nielsen T, Mrowietz U, Rostami-Yazdi M. Detection of fumarate-glutathione adducts in the portal vein blood of rats: evidence for rapid dimethylfumarate metabolism. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(5):447-51.
168. Brennan MS, Matos MF, Li B, Hronowski X, Gao B, Juhasz P, et al. Dimethyl fumarate and monoethyl fumarate exhibit differential effects on KEAP1, NRF2 activation, and glutathione depletion in vitro. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0120254.
169. Lehmann JCU, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, et al. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J Invest Dermatol*. 2007;127(4):835-45.
170. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation*. 2012;9:163.

171. Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, Putluri V, Snowman AM, Putluri N, et al. Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science*. 2018;360(6387):449-53.
172. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1367-76.
173. Miller AE, O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Kappos L, Olsson TP, et al. Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMSO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(11):1625-32.
174. Wolinsky JS, Narayana PA, Nelson F, Datta S, O'Connor P, Confavreux C, et al. Magnetic resonance imaging outcomes from a phase III trial of teriflunomide. *Mult Scler*. 2013;19(10):1310-9.
175. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, Freedman MS, Miller AE, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):247-56.
176. Vermersch P, Czonkowska A, Grimaldi LME, Confavreux C, Comi G, Kappos L, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler*. 2014;20(6):705-16.
177. Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(10):977-86.
178. Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(10):977-86.
179. Bar-Or A. Teriflunomide (Aubagio®) for the treatment of multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2014;262 Pt A:57-65.
180. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*. 2014;74(6):659-74.
181. Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, Peschel C, Decker T. The immunomodulatory drug Leflunomide inhibits cell cycle progression of B-CLL cells. *Leukemia*. 2008;22(3):635-8.
182. Cherwinski HM, Cohn RG, Cheung P, Webster DJ, Xu YZ, Caulfield JP, et al. The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(2):1043-9.
183. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(7):2824-8.
184. Zeyda M, Poglitsch M, Geyeregger R, Smolen JS, Zlabinger GJ, Hörl WH, et al. Disruption of the interaction of T cells with antigen-presenting cells by the active leflunomide

- metabolite teriflunomide: involvement of impaired integrin activation and immunologic synapse formation. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2730-9.
185. Li L, Liu J, Delohery T, Zhang D, Arendt C, Jones C. The effects of teriflunomide on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Neuroimmunol.* 2013;265(1-2):82-90.
 186. Korn T, Magnus T, Toyka K, Jung S. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide--mechanisms independent of pyrimidine depletion. *J Leukoc Biol.* 2004;76(5):950-60.
 187. Dimitrova P, Skapenko A, Herrmann ML, Schleyerbach R, Kalden JR, Schulze-Koops H. Restriction of de novo pyrimidine biosynthesis inhibits Th1 cell activation and promotes Th2 cell differentiation. *J Immunol.* 2002;169(6):3392-9.
 188. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016 [citado 11 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
 189. Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, García-Caldentey J, Espiño M, et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2015;22(8):1169-75.
 190. Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC, Picón C, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology.* 2016;87(11):1076-84.
 191. Hesse D, Sørensen PS. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. *Eur J Neurol.* 2007;14(8):850-9.
 192. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9(7):740-50.
 193. Rudick RA, Lee J-C, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2004;56(4):548-55.
 194. Salama HH, Hong J, Zang YCQ, El-Mongui A, Zhang J. Blocking effects of serum reactive antibodies induced by glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Brain.* 2003;126(Pt 12):2638-47.
 195. Vennegoor A, Rispens T, Strijbis EM, Seewann A, Uitdehaag BM, Balk LJ, et al. Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(5):593-600.
 196. Lundkvist M, Engdahl E, Holmén C, Movérare R, Olsson T, Hillert J, et al. Characterization of anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2013;19(6):757-64.
 197. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med.* 2010;16(4):406-12.

198. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2006;108(7):644-7.
199. Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, et al. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler.* 2010;16(7):810-5.
200. Villar LM, García-Sánchez MI, Costa-Frossard L, Espiño M, Roldán E, Páramo D, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2012;69(2):191-7.
201. Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology.* 2009;73(23):2003-10.
202. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2010;67(6):707-14.
203. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J, Stites T, Chen Y, Dahlke F, et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology.* 2015;84(16):1639-43.
204. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol.* 2011;69(1):83-9.
205. Axelsson M, Malmeström C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundström P, Lycke J, et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20(1):43-50.
206. Piehl F, Kockum I, Khademi M, Blennow K, Lycke J, Zetterberg H, et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Mult Scler.* 2018;24(8):1046-54.
207. Alenda R, Costa-Frossard L, Alvarez-Lafuente R, Espejo C, Rodríguez-Martín E, de la Maza SS, et al. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to IFN-beta in MS. *J Neurol.* 2018;265(1):24-31.
208. Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2011;141(3):348-56.
209. Namdar A, Nikbin B, Ghabaee M, Bayati A, Izad M. Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *J Neuroimmunol.* 2010;218(1-2):120-4.
210. Sellebjerg F, Hesse D, Limborg S, Lund H, Søndergaard HB, Krakauer M, et al. Dendritic cell, monocyte and T cell activation and response to glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(2):179-87.

211. Quirant-Sánchez B, Hervás-García JV, Teniente-Serra A, Brieva L, Moral-Torres E, Cano A, et al. Predicting therapeutic response to fingolimod treatment in multiple sclerosis patients. *CNS Neurosci Ther.* 2018;
212. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, García-Grande A, Rodríguez-Esparragoza L, Elvira V, et al. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. *Front Immunol.* 2018;9:1693.
213. Niino M, Bodner C, Simard M-L, Alatab S, Gano D, Kim HJ, et al. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2006;59(5):748-54.
214. Wipfler P, Oppermann K, Pilz G, Afazel S, Haschke-Becher E, Harrer A, et al. Adhesion molecules are promising candidates to establish surrogate markers for natalizumab treatment. *Mult Scler.* 2011;17(1):16-23.
215. Defer G, Mariotte D, Derache N, Toutirais O, Legros H, Cauquelin B, et al. CD49d expression as a promising biomarker to monitor natalizumab efficacy. *J Neurol Sci.* 2012;314(1-2):138-42.
216. Fenoglio C, De Riz M, Pietroboni AM, Calvi A, Serpente M, Cioffi SMG, et al. Effect of fingolimod treatment on circulating miR-15b, miR23a and miR-223 levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016;299:81-3.
217. Mameli G, Arru G, Caggiu E, Niegowska M, Leoni S, Madeddu G, et al. Natalizumab Therapy Modulates miR-155, miR-26a and Proinflammatory Cytokine Expression in MS Patients. *PLoS ONE.* 2016;11(6):e0157153.
218. Magner WJ, Weinstock-Guttman B, Rho M, Hojnacki D, Ghazi R, Ramanathan M, et al. Dicer and microRNA expression in multiple sclerosis and response to interferon therapy. *J Neuroimmunol.* 2016;292:68-78.
219. Villarrubia N, Rodríguez-Martín E, Alari-Pahissa E, Aragón L, Castillo-Triviño T, Eixarch H, et al. Multi-centre validation of a flow cytometry method to identify optimal responders to interferon-beta in multiple sclerosis. *Clin Chim Acta.* 2019;488:135-42.
220. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1870-80.
221. Antoniol C, Stankoff B. Immunological Markers for PML Prediction in MS Patients Treated with Natalizumab. *Front Immunol.* 2014;5:668.
222. Outteryck O, Zéphir H, Salleron J, Ongagna J-C, Etxeberria A, Collongues N, et al. JC-virus seroconversion in multiple sclerosis patients receiving natalizumab. *Mult Scler.* 2014;20(7):822-9.
223. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Posevitz V, Breuer J, Göbel K, Windhagen S, et al. L-selectin is a possible biomarker for individual PML risk in natalizumab-treated MS patients. *Neurology.* 2013;81(10):865-71.
224. Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B, et al. Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a

- reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Ann Neurol*. 2015;77(3):447-57.
225. de la Hera B, Urcelay E, Brassat D, Chan A, Vidal-Jordana A, Salmen A, et al. Natalizumab-related anaphylactoid reactions in MS patients are associated with HLA class II alleles. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(4):e47.
 226. Uccelli A, Ginocchio F, Mancardi GL, Bassetti M. Primary varicella zoster infection associated with fingolimod treatment. *Neurology*. 2011;76(11):1023-4.
 227. Loebermann M, Winkelmann A, Hartung H-P, Hengel H, Reisinger EC, Zettl UK. Vaccination against infection in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(3):143-51.
 228. Longbrake EE, Naismith RT, Parks BJ, Wu GF, Cross AH. Dimethyl fumarate-associated lymphopenia: Risk factors and clinical significance. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2015;1.
 229. Jones JL, Phuah C-L, Cox AL, Thompson SA, Ban M, Shawcross J, et al. IL-21 drives secondary autoimmunity in patients with multiple sclerosis, following therapeutic lymphocyte depletion with alemtuzumab (Campath-1H). *J Clin Invest*. 2009;119(7):2052-61.
 230. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343(13):898-904.
 231. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*. 2001;357(9268):1576-82.
 232. Freedman MS, Comi G, De Stefano N, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BMJ, et al. Moving toward earlier treatment of multiple sclerosis: Findings from a decade of clinical trials and implications for clinical practice. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3(2):147-55.
 233. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(2):96-120.
 234. Comi G. Induction vs. escalating therapy in multiple sclerosis: practical implications. *Neurol Sci*. 2008;29 Suppl 2:S253-255.
 235. Comi G, Radaelli M, Soelberg Sørensen P. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Lancet*. 2017;389(10076):1347-56.
 236. Ayrignac X, Bilodeau P-A, Prat A, Girard M, Labauge P, Le Lorier J, et al. Assessing the risk of multiple sclerosis disease-modifying therapies. *Expert Rev Neurother*. 2019;19(7):695-706.
 237. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Soneson C, Bonnier G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*. 2016;22(12):1550-9.

238. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;81(6):857-70.
239. Oberwahrenbrock T, Traber GL, Lukas S, Gabilondo I, Nolan R, Songster C, et al. Multicenter reliability of semiautomatic retinal layer segmentation using OCT. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(3):e449.
240. Wattjes MP, Rovira À, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, de Stefano MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):597-606.
241. Pullicino R, Radon M, Biswas S, Bhojak M, Das K. A Review of the Current Evidence on Gadolinium Deposition in the Brain. *Clin Neuroradiol*. 2018;28(2):159-69.
242. Trojano M, Tintore M, Montalban X, Hillert J, Kalincik T, Iaffaldano P, et al. Treatment decisions in multiple sclerosis - insights from real-world observational studies. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(2):105-18.
243. Giovannoni G, Tomic D, Bright JR, Havrdová E. «No evident disease activity»: The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(9):1179-87.
244. De Stefano N, Stromillo ML, Giorgio A, Battaglini M, Bartolozzi ML, Amato MP, et al. Long-term assessment of no evidence of disease activity in relapsing-remitting MS. *Neurology*. 2015;85(19):1722-3.
245. Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, Chitnis T, Weiner HL. Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):152-8.
246. Kappos L, De Stefano N, Freedman MS, Cree BA, Radue E-W, Sprenger T, et al. Inclusion of brain volume loss in a revised measure of «no evidence of disease activity» (NEDA-4) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(10):1297-305.
247. Imitola J, Racke MK. Is no evidence of disease activity a realistic goal for patients with multiple sclerosis? *JAMA Neurol*. 2015;72(2):145-7.
248. Longbrake EE, Ramsbottom MJ, Cantoni C, Ghezzi L, Cross AH, Piccio L. Dimethyl fumarate selectively reduces memory T cells in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2016;22(8):1061-70.
249. Longbrake EE, Cantoni C, Chahin S, Cignarella F, Cross AH, Piccio L. Dimethyl fumarate induces changes in B- and T-lymphocyte function independent of the effects on absolute lymphocyte count. *Mult Scler*. 2018;24(6):728-38.
250. Gandoglia I, Ivaldi F, Laroni A, Benvenuto F, Solaro C, Mancardi G, et al. Teriflunomide treatment reduces B cells in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(6):e403.

251. Sainz de la Maza S, Medina S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Monreal E, Tejeda-Velarde A, et al. Factors associated with dimethyl fumarate-induced lymphopenia. *J Neurol Sci*. 2019;398:4-8.
252. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Posevitz-Fejfar A, Wiendl H, Klotz L. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(1):e183.
253. Lundy SK, Wu Q, Wang Q, Dowling CA, Taitano SH, Mao G, et al. Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(2):e211.
254. Khatri BO, Garland J, Berger J, Kramer J, Sershon L, Olapo T, et al. The effect of dimethyl fumarate (Tecfidera™) on lymphocyte counts: A potential contributor to progressive multifocal leukoencephalopathy risk. *Mult Scler Relat Disord*. 2015;4(4):377-9.
255. Chaves C, Ganguly R, Ceresia C, Camac A. Lymphocyte subtypes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2017;3(2):2055217317702933.
256. Ghadiri M, Rezk A, Li R, Evans A, Luessi F, Zipp F, et al. Dimethyl fumarate-induced lymphopenia in MS due to differential T-cell subset apoptosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(3):e340.
257. Wu Q, Wang Q, Mao G, Dowling CA, Lundy SK, Mao-Draayer Y. Dimethyl Fumarate Selectively Reduces Memory T Cells and Shifts the Balance between Th1/Th17 and Th2 in Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol*. 2017;198(8):3069-80.
258. Liu G-Z, Fang L-B, Hjelmström P, Gao X-G. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007;13(2):149-55.
259. Song Z-Y, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, et al. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS ONE*. 2014;10(4):e0124923.
260. Smith MD, Martin KA, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate alters B-cell memory and cytokine production in MS patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(5):351-5.
261. Longbrake EE, Cantoni C, Chahin S, Cignarella F, Cross AH, Piccio L. Dimethyl fumarate induces changes in B- and T-lymphocyte function independent of the effects on absolute lymphocyte count. *Mult Scler*. 2018;24(6):728-38.
262. Li R, Rezk A, Ghadiri M, Luessi F, Zipp F, Li H, et al. Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2017;198(2):691-8.
263. Cunill V, Massot M, Clemente A, Calles C, Andreu V, Núñez V, et al. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Is Characterized by a T Follicular Cell Pro-Inflammatory Shift, Reverted by Dimethyl Fumarate Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:1097.
264. Schwarz A, Balint B, Korporal-Kuhnke M, Jarius S, von Engelhardt K, Fürwentsches A, et al. B-cell populations discriminate between pediatric- and adult-onset multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(1):e309.

265. Comabella M, Cantó E, Nurtdinov R, Río J, Villar LM, Picón C, et al. MRI phenotypes with high neurodegeneration are associated with peripheral blood B-cell changes. *Hum Mol Genet.* 2016;25(2):308-16.
266. Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, et al. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(7):677-93.
267. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(9):886-94.
268. Grützke B, Hücke S, Gross CC, Herold MVB, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, et al. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(2):119-30.
269. Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 2010;30(1):99-105.
270. McComish J, Mundy J, Sullivan T, Proudman SM, Hissaria P. Changes in peripheral blood B cell subsets at diagnosis and after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory parameters. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(4):421-32.
271. Montes Diaz G, Fraussen J, Van Wijmeersch B, Hupperts R, Somers V. Dimethyl fumarate induces a persistent change in the composition of the innate and adaptive immune system in multiple sclerosis patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):8194.
272. Zindler E, Zipp F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010;24(4):551-62.
273. Faissner S, Plemel JR, Gold R, Yong VW. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;
274. De Mercanti S, Rolla S, Cucci A, Bardina V, Cocco E, Vladic A, et al. Alemtuzumab long-term immunologic effect: Treg suppressor function increases up to 24 months. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(1):e194.
275. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001;97(10):3146-51.
276. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology.* 2009;126(4):458-65.
277. Caruana P, Lemmert K, Ribbons K, Lea R, Lechner-Scott J. Natural killer cell subpopulations are associated with MRI activity in a relapsing-remitting multiple sclerosis patient cohort from Australia. *Mult Scler.* 2017;23(11):1479-87.
278. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, García-Grande A, Rodríguez-Esparragoza L, Elvira V, et al. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients

- With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. *Front Immunol.* 2018;9:1693.
279. Smith MD, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate treatment alters NK cell function in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2018;48(2):380-3.
 280. Mehta D, Miller C, Arnold DL, Bame E, Bar-Or A, Gold R, et al. Effect of dimethyl fumarate on lymphocytes in RRMS: Implications for clinical practice. *Neurology.* 2019;92(15):e1724-38.
 281. Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. *J Immunol.* 1999;162(4):2095-102.
 282. Kirsch BM, Zeyda M, Stuhlmeier K, Grisar J, Smolen JS, Watschinger B, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, interferes with dendritic cell function. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R694-703.
 283. Weigmann B, Jarman ER, Sudowe S, Bros M, Knop J, Reske-Kunz AB. Induction of regulatory T cells by leflunomide in a murine model of contact allergen sensitivity. *J Invest Dermatol.* 2006;126(7):1524-33.
 284. Wang T-Y, Li J, Li C-Y, Jin Y, Lü X-W, Wang X-H, et al. Leflunomide induces immunosuppression in collagen-induced arthritis rats by upregulating CD4+CD25+ regulatory T cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(1):45-53.
 285. Ringheim GE, Lee L, Laws-Ricker L, Delohery T, Liu L, Zhang D, et al. Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Neurol.* 2013;4:169.
 286. Merrill JE, Hanak S, Pu S-F, Liang J, Dang C, Iglesias-Bregna D, et al. Teriflunomide reduces behavioral, electrophysiological, and histopathological deficits in the Dark Agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol.* 2009;256(1):89-103.
 287. Ochoa-Repáraz J, Colpitts SL, Kircher C, Kasper EJ, Telesford KM, Begum-Haque S, et al. Induction of gut regulatory CD39+ T cells by teriflunomide protects against EAE. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(6):e291.
 288. Klotz L, Eschborn M, Lindner M, Liebmann M, Herold M, Janoschka C, et al. Teriflunomide treatment for multiple sclerosis modulates T cell mitochondrial respiration with affinity-dependent effects. *Sci Transl Med.* 2019;11(490).
 289. Gandoglia I, Ivaldi F, Laroni A, Benvenuto F, Solaro C, Mancardi G, et al. Teriflunomide treatment reduces B cells in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017;4(6):e403.
 290. Comi G, Miller AE, Benamor M, Truffinet P, Poole EM, Freedman MS. Characterizing lymphocyte counts and infection rates with long-term teriflunomide treatment: Pooled analysis of clinical trials. *Mult Scler.* 2019;1352458519851981.
 291. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013;43(11):2797-809.

292. Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, Rounds WH, Lim J, Johnson J, et al. Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* 2017;133(1):43-60.
293. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26(3):136-40.
294. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(4):203-20.
295. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):634-43.
296. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* 2001;291(5502):319-22.
297. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-51.
298. Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, Cui J, Pelker JW, Jussif J, et al. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2007;182(1-2):124-34.
299. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJI, Akiba H, Tushima F, et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2003;198(1):71-8.
300. Zacca ER, Onofrio LI, Acosta CDV, Ferrero PV, Alonso SM, Ramello MC, et al. PD-L1+ Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment. *Front Immunol.* 2018;9:2241.
301. Solly F, Angelot-Delettre F, Ticchioni M, Geneviève F, Rambaud H, Baseggio L, et al. Standardization of Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematological Malignancies: The FranceFlow Group Experience. *Cytometry A.* 2019;

Anexos

ANEXO A. Búsqueda de biomarcadores de respuesta al tratamiento con teriflunomida.

Antecedentes: Teriflunomida es un tratamiento modificador de la enfermedad aprobado para la EM que inhibe a la DHODH, implicada en la síntesis *de novo* de pirimidinas. Nuestro trabajo sobre su efecto en diferentes subpoblaciones leucocitarias ha contribuido a dilucidar su mecanismo de acción. Para completar este trabajo, quisimos estudiar si los cambios en estas subpoblaciones se asociaban a la respuesta al tratamiento.

Pacientes: Se incluyeron 32 pacientes con EMRR que iniciaban tratamiento con teriflunomida.

Métodos: Se aislaron CMSP antes de iniciar tratamiento y 6 meses después, mediante separación en gradiente de densidad y se criopreservaron hasta su utilización. Se estudiaron subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria y reguladoras por citometría de flujo. Los ensayos se hicieron en paralelo en las muestras basales y a los 6 meses de tratamiento.

Transcurrido un año de tratamiento, los pacientes se clasificaron en NEDA y ODA atendiendo a su actividad clínica y en resonancia. En el grupo NEDA se incluyeron aquellos con ausencia de brotes, de progresión en la escala EDSS y de actividad en resonancia magnética en ese periodo de tiempo. Por el contrario, los pacientes con al menos un brote o aumento de al menos un punto en el índice de EDSS o bien con nuevas lesiones en T2 o captantes de gadolinio, se incluyeron en el grupo ODA.

Las diferencias en las distintas subpoblaciones leucocitarias entre el estado basal y los 6 meses de tratamiento en los dos grupos de pacientes se analizaron mediante el test de Wilcoxon para datos apareados. En este caso no aplicamos la corrección de Bonferroni debido al bajo número de pacientes incluidos en el estudio, que fue considerado como un piloto a validar en una cohorte más amplia de pacientes.

Resultados: Tras un año de tratamiento con teriflunomida, 19 pacientes cumplían características de NEDA y 13 de ODA. Las principales características clínicas y demográficas se muestran en la tabla 3. Sólo se observaron diferencias significativas entre los grupos en la edad al inicio del tratamiento y en el sexo, habiendo más hombres y siendo más jóvenes los pacientes no respondedores a un año.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes.

	NEDA (n=19)	ODA (n=13)	p
Sexo (hombre/mujer)	4/15	8/5	0.03
Edad al inicio (años)	46,75	41,07	0.02
Mdn (25%-75% RIC)	(39,77-54,25)	(33,25-45,36)	
Duración de la enfermedad (meses)	130,7	83,73	NS
Mdn (25%-75% RIC)	(53,63-214,9)	(52,57-127,7)	
EDSS a inicio	2.0	1,5	NS
Mdn (25%-75% RIC)	(1.5-3.5)	(1.2-3.0)	
Brotos en los dos años previos al inicio del tratamiento.	1	1.0	NS
Mdn (25%-75% RIC)	(0.0-1.0)	(0.0-2.0)	

EDSS, Expanded Disability Scale; Mdn, mediana; NEDA, no evident disease activity; ODA, ongoing disease activity; RIC, rango intercuartil.

Los resultados obtenidos en las diferentes subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria e inmunomoduladoras estudiadas en los dos grupos de pacientes se muestran en las tablas 4 y 5. Al clasificar a los pacientes en función de su evolución clínica, observamos que los cambios en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ terminalmente diferenciados y plasmablastos se mantenía en ambos grupos, aunque esta disminución era más marcada en los linfocitos terminalmente diferenciados de los respondedores óptimos que en los respondedores

subóptimos. Además, observamos cambios restringidos al grupo de los respondedores óptimos como son una disminución significativa de los linfocitos T CD8+ totales y terminalmente diferenciados, así como un aumento significativo de las células NK CD56 bright y de los monocitos CD14+ PD-L1+. Si bien en el caso de esta última subpoblación se observa un aumento en los respondedores subóptimos que casi alcanza la significación estadística.

Tabla 4. Cambios inducidos por teriflunomide en subpoblaciones efectoras y de memoria.

Subpoblaciones	NEDA (n=19)			ODA (n=13)		
	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p
CD4+T	37,46±1,98	36,65±2,54	NS	39,62±3,01	37,26±3,59	NS
CD4+N	20,34±1,69	19,35±2,01	NS	21,25±2,42	19,35±2,69	NS
CD4+CM	8,49±0,74	9,08±0,84	NS	10,36±1,03	10,10±1,26	NS
CD4+EM	6,51±0,59	6,52±0,61	NS	6,0±0,69	6,35±1,07	NS
CD4+TD	2,10±0,27	1,72±0,23	0,007	1,93±0,34	1,45±0,29	0,034
CD8+T	13,64±1,17	11,90±1,35	0,008	12,48±1,15	13,22±1,83	NS
CD8+N	5,17±0,66	4,75±0,71	NS	5,42±0,89	4,79±0,80	NS
CD8+CM	0,55±0,09	0,53±0,10	NS	0,56±0,09	0,60±0,08	NS
CD8+EM	2,47±0,21	2,34±0,35	NS	2,58±0,43	3,37±0,77	NS
CD8+TD	5,44±0,89	4,26±0,72	0,022	3,91±0,68	4,46±1,08	NS
NKT	3,49±0,55	3,19±0,67	NS	3,56±1,06	4,07±1,04	NS
NK	10,57±1,30	9,79±0,79	NS	11,82±1,95	12,31±2,19	NS
CD19+ T	10,21±1,34	9,61±0,95	NS	10,48±1,50	11,75±2,68	NS
Bmem	2,98±0,32	2,47±0,28	NS	2,21±0,31	2,78±0,65	NS
PB	0,11±0,01	0,06±0,01	0,009	0,13±0,02	0,05±0,01	0,002
CD14+	20,33±1,97	24,74±2,85	NS	18,41±2,86	19,58±1,77	NS

Bmem, células B de memoria; M±EE, media ± error estándar; MC, memoria central; ME, memoria efectora; N, naïve; NEDA, no evident disease activity; NK, células Natural killer; NKT, células natural killer T; TD, terminalmente diferenciadas; PB, plasmablastos; T, totales; TD, terminalmente diferenciados; ODA, ongoing disease activity.

Tabla 5. Cambios inducidos por teriflunomida en subpoblaciones inmunomoduladoras.

Subpoblaciones	NEDA (n=19)			ODA (n=13)		
	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p
Treg	1,31±0,11	1,19±0,12	NS	1,55±0,18	1,35±0,19	NS
Breg	0,09±0,02	0,08±0,01	NS	0,09±0,02	0,11±0,03	NS
CD56^{bright}	1,12±0,16	1,49±0,25	0,035	0,81±0,23	0,93±0,10	NS
CD4+ IL-10+	0,17±0,02	0,19±0,05	NS	0,22±0,08	0,15±0,03	NS
CD8+ IL-10+	0,14±0,01	0,17±0,03	NS	0,15±0,05	0,17±0,03	NS
CD19+ IL-10+	0,09±0,02	0,10±0,03	NS	0,08±0,01	0,06±0,01	NS
CD14+ PD-L1	0,28±0,07	0,75±0,24	0,038	0,19±0,03	0,75±0,25	0,052

Breg, Células B reguladoras; M±EE, media ± error estándar; NEDA, no evident disease activity; ODA, ongoing disease activity; Treg, Células T reguladoras.

Finalmente, estudiamos el efecto del fármaco sobre la producción de citocinas proinflamatorias en los dos grupos de pacientes y no observamos variaciones significativas en ninguna de ellas (tabla 6).

Conclusiones: Los cambios observados se limitan a algunas subpoblaciones reguladoras y efectoras tal y como se vio en el grupo total. La disminución de los linfocitos T CD8+ totales y terminalmente diferenciados parece restringirse al grupo NEDA, así como el aumento de las células NK CD56 bright. Además, los linfocitos CD8+ terminalmente diferenciados parten de valores más elevados al inicio del tratamiento y quizá en el futuro pudieran establecerse como biomarcadores antes de empezar la terapia. Futuros estudios demostrarán su utilidad para predecir la respuesta al tratamiento.

Tabla 6. Cambios inducidos por teriflunomida en la producción de citocinas.

Subpoblaciones	NEDA (n=19)			ODA (n=13)		
	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p	Inicio (M±EE)	6 meses (M±EE)	p
CD4+ IFN-γ+	2,91±0,40	2,94±0,35	NS	3,75±0,58	3,30±0,49	NS
CD4+ TNF-α+	20,05±2,34	21,95±1,99	NS	27,71±2,25	22,42±2,84	NS
CD4+ IL-17+	0,16±0,04	0,25±0,06	NS	0,19±0,03	0,26±0,05	NS
CD4+ GM-CSF+	1,79±0,18	2,12±0,22	NS	2,61±0,21	2,61±0,44	NS
CD8+ IFN-γ+	2,57±0,37	2,79±0,38	NS	3,26±0,59	3,16±0,64	NS
CD8+ TNF-α+	4,17±0,52	4,73±0,49	NS	5,73±1,08	5,16±1,06	NS
CD8+ IL-17+	0,09±0,05	0,06±0,02	NS	0,06±0,01	0,14±0,09	NS
CD8+ GM-CSF+	0,60±0,06	0,59±0,07	NS	1,11±0,27	1,22±0,30	NS
CD19+ GM-CSF+	0,38±0,06	0,38±0,05	NS	0,38±0,08	0,32±0,04	NS
CD19+ TNF-α+	3,36±0,67	3,08±0,43	NS	3,59±0,52	3,49±0,60	NS

M±EE, media ± error estándar; NEDA, no evident disease activity; ODA, ongoing disease activity.

ANEXO B. Patente obtenida como resultado del estudio de dimetilfumarato

Method for monitoring and predicting the efficacy of treatment in a multiple sclerosis patient.

PATENTE INTERNACIONAL 17 382 331.1.

ANEXO C. Artículos relacionados

Cuello JP; Martínez M; Kuhle J; García-Domínguez JM; Lozano A; Romero F; Higuera Y; Meldaña A; Goicochea H; García-Tizon S; de-León J; Michalak Z; Barro C; Alvarez-Lafuente R; Medina S; Fernandez JI; Tejeda-Velarde A; Domínguez-Mozo MI; Muriel A; de-Andrés C, Villar LM. *Neurofilament light chain levels in pregnant multiple sclerosis patients: a prospective cohort study*. Eur J Neurol. 2019;26(9):1200-1204

Sainz de la Maza S, Medina S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Monreal E, Tejeda-Velarde A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. *Factors associated with dimethyl fumarate-induced lymphopenia*. J Neurol Sci. 2019;8;398:4-8.

Malhotra S, Villar LM, Costa C, Midaglia L, Cubedo M; Medina S, Fissolo N, Rio J, Castillo J, Alvarez-Cermeño JC, Sanchez A, Montalban X. *Circulating EZH2 positive T cells are decreased in multiple sclerosis patients*. Environ Int. 2018;121(Pt 2):1079-1086.

